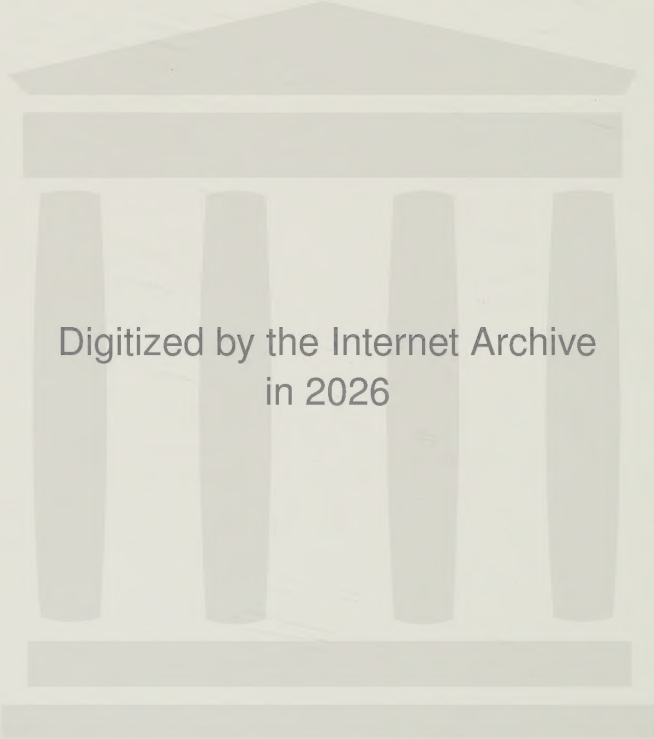


**Vergleichende biochemische Untersuchungen zur
Isolierung und Charakterisierung des menschlichen
Gerinnungsfaktors VIII (antithrombophiles Globulin A)
aus Citrat- und Heparinplasma**

H. Bloemer

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

druckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Dekan
Medizinischen Fakultät
Universität Düsseldorf

: Prof. Dr. Krüskemper

Referent

gez.: Priv. Doz. Dr. Trobisch

Korreferent

gez.: Prof. Dr. Fischer



Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen und
Transfusionsmedizin
der Medizinischen Einrichtungen der Universität
Düsseldorf

VERGLEICHENDE BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES MENSCHLICHEN
GERINNUNGSFAKTORS VIII (ANTIHAEMOPHILES GLOBULIN A)
AUS CITRAT- UND HEPARINPLASMA

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Heinz Bloemer
aus Hochneukirch

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Funktionen des Gerinnungsfaktors VIII	1
1.2. Biochemische Daten	4
1.3. Die Stellung des Faktors VIII im Blutgerinnungssystem	6
1.4. Aufgabenstellung	7
2. MATERIAL	7
3. ANALYTISCHE METHODEN	10
3.1. Methoden zur Bestimmung von Eiweißkonzentrationen	10
3.2. Bestimmung der Konzentration des Faktors VIII _{AP} mit dem Elektro-Immun-Assay, modifiziert nach Laurell	12
3.3. Bestimmung der Faktor-VIII-Aktivität im Einphasentest	15
3.4. Bestimmung der Fibrinogenkonzentration mit Hilfe der radialen Immundiffusion	16
3.5. Bestimmung des Einbaus von ³ H-Heparin und ¹⁴ C-Natrium-Citrat in den Faktor VIII	17
3.6. Bestimmung der Elutionskoeffizienten von Faktor VIII _{AP} , Faktor VIII _{COAG} und Fibrinogen	17
4. PRÄPARATIVE METHODEN	18
4.1. Herstellung eines Faktor-VIII-Konzentrates	18
4.2. Verteilungschromatographie	20

	<u>Seite</u>
5. ERGEBNISSE	21
5.1. Fällungsverhalten des Faktors VIII bzw. des Fibrinogens bei Isolierung aus Heparin- bzw. Citratplasma	21
5.2. Reinheit der Faktor-VIII-reichen Fraktionen	21
5.3. Ergebnisse der chromatographischen Unter- suchungen	22
6. DISKUSSION	57
7. ZUSAMMENFASSUNG	67
8. LITERATURVERZEICHNIS	71

1. EINLEITUNG

Die in den letzten Jahren durch intensive Forschung erheblich erweiterten Kenntnisse über Struktur und Funktionen des Gerinnungsfaktors VIII führten leider auch zu einer erheblichen Verwirrung in der Nomenklatur, die erst 1975 durch die International Society on Thrombosis and Haemostasis beseitigt wurde. Die dort festgelegte Nomenklatur sei zunächst kurz vorgestellt und erläutert (29).

1.1. Die Funktionen des Gerinnungsfaktors VIII

1.1.1. Die Gerinnungsaktivität des Faktors VIII = Faktor VIII^I_{COAG}

Es handelt sich um eine Eigenschaft des Faktors VIII, die nur in frisch gewonnenem und mit gerinnungshemmenden Stoffen versehenem Plasma nachweisbar ist, nicht aber im Serum (1). Sie ist zur Funktionstüchtigkeit des endogenen Gerinnungssystems unbedingt erforderlich und normalisiert die bei der Haemophilie A und dem Morbus von Willebrand bestehenden Gerinnungsdefekte. Dies äußert sich klinisch im Sistieren der Blutung, labortechnisch in der Normalisierung der Recalcifizierungszeit, des Prothrombinkonsumptions-

testes, der partiellen Thromboplastinzeit und der Faktor-VIII-Aktivität (9, 10).

1.1.2. Die homologe, Antikörper neutralisierende Aktivität des Faktors VIII = Faktor VIII_{NEUT}

Von dieser Eigenschaft nimmt man an, daß sie mit Faktor VIII_{COAG} identisch ist (11). Man versteht darunter die Fähigkeit des Faktors VIII, homologe Antikörper, die spezifisch gegen Faktor VIII_{COAG} gerichtet sind, zu neutralisieren. Die mit Hilfe des Inhibitor-Neutralisationstestes nach DENSON nachweisbaren Spiegel an Faktor VIII_{NEUT} stehen meist in guter Korrelation zu der vorhandenen Menge an Faktor VIII_{COAG}. Im Gegensatz zu Faktor VIII_{COAG} ist Faktor VIII_{NEUT} aber auch im Serum und bei 15% der Haemophilen vom Typ A⁽⁺⁾ in normaler Menge nachweisbar. Es wird vermutet, daß das im Serum nachweisbare Faktor VIII_{NEUT} teilweise inaktivierter Faktor VIII_{COAG} ist, während die genannte Gruppe von Haemophilen wahrscheinlich ein nicht funktionstüchtiges Faktor VIII_{COAG} bildet (11, 22, 39, 61).

1.1.3. Das Faktor VIII assoziierte Protein = Faktor VIII_{AP}

Hierbei handelt es sich um ein Protein, das mit

Hilfe monospezifischer heterologer Antikörper, die in Tieren gegen menschliche Faktor-VIII-Konzentrate gebildet wurden, nachgewiesen werden kann. Dieses Protein findet sich im Plasma wie im Serum und zwar in ähnlicher Konzentration sowohl bei Gesunden als auch bei Haemophilen. Erheblich erniedrigte Spiegel finden sich bei Patienten mit Morbus von Willebrand (17, 31, 54, 79). Zu berücksichtigen ist allerdings, daß die heterologen Antikörper nicht nur gegen Faktor VIII_{AP} sondern auch gegen Faktor VIII_{COAG} gerichtet sind.

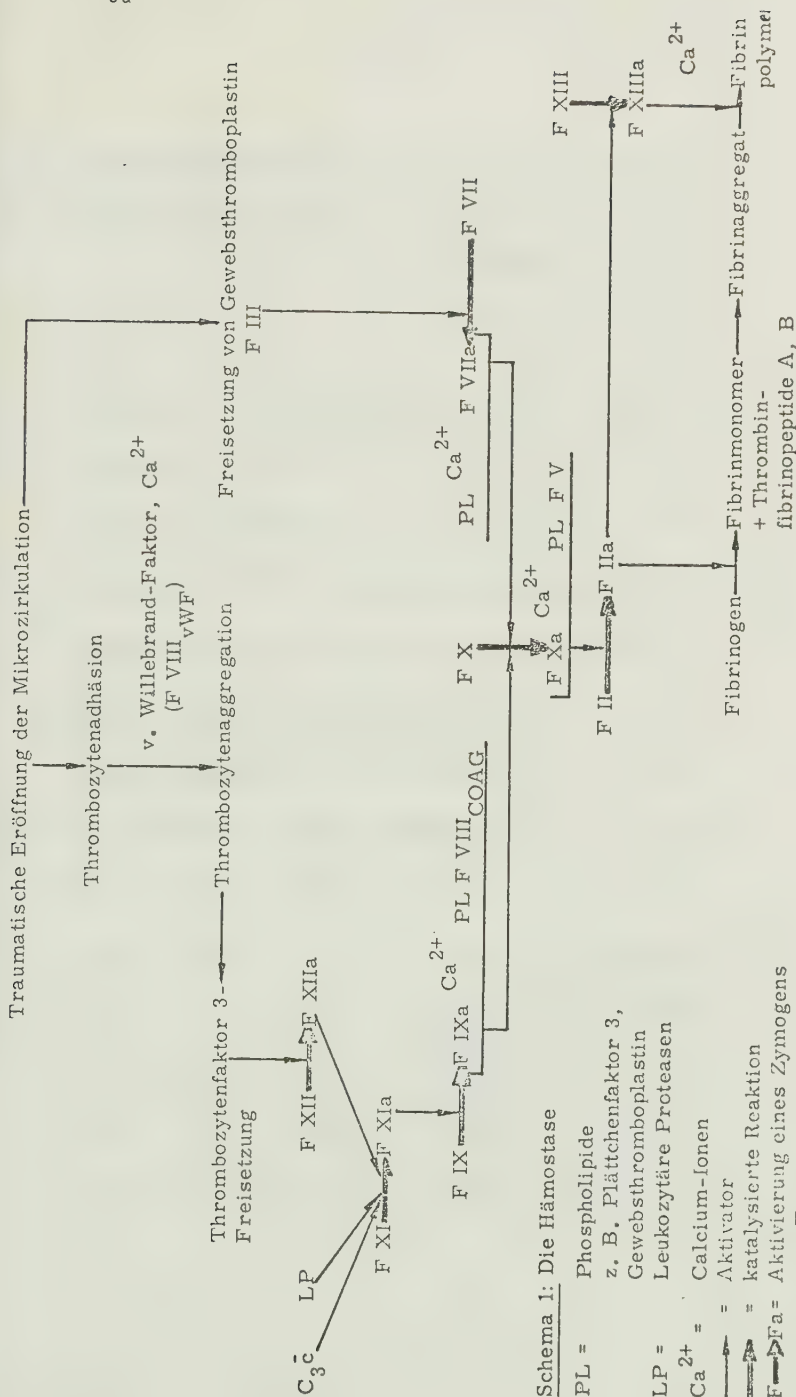
- 1.1.4. Die von Willebrand-Faktor-Aktivität = Faktor VIII_{VWF}
Bei Faktor VIII_{VWF} handelt es sich um eine biologische Aktivität des Faktors VIII, den beim Morbus von Willebrand (45, 46, 77, 78) bestehenden thrombocytären Defekt zu beheben. Da dieser Defekt nicht nur mit Hilfe von Faktor-VIII-Präparationen aus Normalplasma bzw. -serum behoben werden kann, sondern auch aus Haemophilenplasma bzw. -serum, muß es sich um eine spezielle Eigenschaft handeln, die sich von Faktor VIII_{COAG} oder Faktor VIII_{NEUT} unterscheidet. Es wurden aber auch schon Fälle des Morbus von Willebrand beschrieben, bei denen die Konzentration des

Faktor VIII_{COAG} zeigt eine extreme Empfindlichkeit gegenüber thermischen Belastungen, starken pH-Verschiebungen und Entzug von Calciumionen, wodurch er, ebenso wie durch Einwirkung von Thrombin (28, 50) zerstört wird.

Der Komplextheorie wird von McKEE widersprochen, der den Faktor VIII für ein Glykoprotein mit einer Molekularmasse von 1×10^6 daltons hält, das aus funktionstüchtigen identischen Untereinheiten mit einer Molekularmasse von $1,9 \times 10^5$ daltons besteht, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Andere Untersucher finden hingegen nach Reduktion von hochgereinigtem Faktor VIII bis zu sieben heterogene Untereinheiten mit einer Molekularmasse zwischen 3×10^4 und 2×10^5 daltons. Einige dieser Untereinheiten sind aber wahrscheinlich identisch (13, 52, 53).

1.3. Die Stellung des Faktors VIII im Blutgerinnungssystem (Schema 1)

Wie bereits oben erwähnt, ist der Faktor VIII für die Funktionstüchtigkeit des endogenen Gerinnungssystems unentbehrlich. Er bildet hier, zusammen mit dem aktivierten Faktor IX, Calciumionen und Phospho-



Schema 1: Die Hämostase

lipidmizellen, den endogenen Aktivator des Faktors X, ist also am letzten Schritt im Ablauf des endogenen Gerinnungssystems beteiligt (32, 35, 71).

1.4. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Faktor VIII aus Humanplasmen, denen steigende Mengen Heparin zugesetzt wurden, isoliert und anschließend mit Hilfe chromatographischer Methoden untersucht, ob sich die molekulare Masse und das chromatographische Erscheinungsbild von Faktor VIII_{AP} bzw. Faktor VIII_{COAG} in Abhängigkeit von der zugesetzten Heparinmenge änderten. Mit Hilfe radioaktiv markierten Heparins wurde auch der Frage nachgegangen, ob Heparin in den Faktor VIII eingebaut wird. Zu Vergleichszwecken wurde Faktor VIII ebenfalls aus Citratplasma isoliert und chromatographisch untersucht.

2. MATERIAL

- 2.1. Heparin (Mucosa) 5.000 I.E./ml, Liquemin^(R) (Hoffmann-
la Roche, Grenzach/Wyhlen)
- 2.2. ³₁H-Heparin 1 mCi/mg (New England Nuclear, Dreieichen-
hain/FFM)

- 2.3. Tri-Natrium-Citrat x 5 H₂O (Merck, Darmstadt)
- 2.4. Citronensäure (Merck, Darmstadt)
- 2.5. Citronensäure 2,4 - ¹⁴C, 5 mCi/mg (New England Nuclear, Dreieichenhain/FFM)
- 2.6. Natrium-Citrat-Citronensäure-Puffer 0,1 mol, pH 4,8
- 2.7. EDTA (Äthylen-diamin-tetraessigsäure-Na₂-Salz) (Serva, Heidelberg)
- 2.8. Natriumsalz der Diäthylbarbitursäure (Merck, Darmstadt)
- 2.9. Barbitursäure (Merck, Darmstadt)
- 2.10. Aluminium-Hydroxidpaste, 2%-Suspension in 0,15 mol NaCl-Lösung (British Drug House)
- 2.11. Calciumphosphat (Merck, Darmstadt)
- 2.12. β-Alanin (Serva, Heidelberg)
- 2.13. Äthanol - mindestens 96% - (Merck, Darmstadt)
- 2.14. Agarose: Indubiose A 37 (Industrie Biologique Francaise, Gennevillier's, Frankreich)
- 2.15. Agarose für die Verteilungschromatographie: Sepharose 6BC1 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

- 2.16. Diisopropyl-fluoro-phosphat (Serva, Heidelberg)
- 2.17. Biuret-Reagenz zur Eiweißbestimmung (Merck, Darmstadt)
- 2.18. Kupfer-sulfat x 5 H₂O (Merck, Darmstadt)
- 2.19. 30%ige Natronlauge (g/v)
- 2.20. Mikrobiuretreagenz: 210 mg Kupfersulfat in 100 ml
Natronlauge 30%
- 2.21. Anti-Faktor-VIII-assoziiertes-Protein-Serum vom
Kaninchen (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)
- 2.22. Partigen-Platten zur quantitativen Bestimmung von
Proteinen mit Hilfe der radialen Immundiffusion
(Mancini-Technik): Fibrinogen (Behringwerke AG,
Marburg/Lahn)
- 2.23. Gerinnungsfaktor-VIII-Mangelplasma (Behringwerke AG,
Marburg/Lahn)
- 2.24. Partielles Thromboplastinreagenz, Pathromptin^(R)
(Behringwerke AG, Marburg/Lahn)
- 2.25. Serum-Albumin vom Rind, reinst (Behringwerke AG,
Marburg/Lahn)
- 2.26. Coomassie Brilliant Blue R-Färbelösung für Elektro-
Immun-Assays nach Laurell: 4,5 l Äthanol 96%ig,

4,5 l dest. Wasser, 1,0 l Eisessig und 50 g Coomassie Brilliant Blue R (E. Gurr Ltd., Searle Diagnostic, High Wycombe, Bucks, U.K.)

Ungelöste Partikel werden durch Filtration aus der Färbelösung entfernt.

2.27. Entfärberlösung für Coomassie-Färbung: 4,5 l Äthanol 96%, 4,5 l dest. Wasser, 1,0 l Eisessig

2.28. HEPES, n-2-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure, Puffersubstanz, die keine komplexierende Wirkung auf Erdalkali-Ionen hat (Serva, Heidelberg)

2.29. 0,075 mol HEPES - 0,075 mol NaCl-Pufferlösung pH 7,5 zur Chromatographie

2.30. Aprotinin, polyvalenter Proteinaseinhibitor aus Rinderlunge, Trasylol^(R) (Bayerwerke, Leverkusen)

Alle Reagenzien waren - sofern nicht anders vermerkt - von p.a. Qualität.

3. ANALYTISCHE METHODEN

3.1. Methoden zur Bestimmung von Eiweißkonzentrationen

3.1.1. Messung der Extinktion bei 280 nm

Prinzip:

Diese Methode beruht darauf, daß die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bei 280 nm ihr Absorptionsmaximum aufweisen. Die Messung ist damit der Konzentration dieser Aminosäuren in Proteingemischen, jedoch nur bedingt der Eiweißkonzentration proportional.

Methode:

Mit Hilfe eines Durchflußspektrophotometers (Uvicord der Firma LKB) und eines Schreibers wurde eine kontinuierliche Messung und Aufzeichnung der Extinktion bei 280 nm während der Verteilungschromatographie vorgenommen. Als Leerwert diente dabei die Extinktion des Eluanten, in unserem Fall HEPES-Puffer.

3.1.2. Biuretmethode mit folgenden Modifikationen

a) Bei Eiweißmengen $\geq 0,5$ g/100 ml

5 ml Biuretreagenz + 0,1 ml Probe

b) Bei Eiweißmengen $\geq 0,5$ mg/ml

0,9 ml Biuretreagenz + 0,1 ml Probe

In beiden Fällen wurde nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten die Extinktion bei 545 nm auf einem Spektralphotometer der Firma Beckmann abgelesen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, die anhand einer geometrischen Verdünnungsreihe von Humanalbumin aufgestellt wurde.

c) Bei Eiweißmengen $\geq 40 \mu\text{g/ml}$ Mikrobiuretmethode

P1: 0,5 ml Probe + 0,25 ml Mikrobiuretreagenz

A1: 0,5 ml A.dest. + 0,25 ml Mikrobiuretreagenz

P2: 0,5 ml Probe + 0,25 ml 30%ige NaOH

A2: 0,5 ml A.dest. + 0,25 ml 30%ige NaOH

(P1 = Probenhauptwert, A1 = Reagenzleerwert,

P2 = Probenleerwert₁, A2 = Reagenzleerwert₂)

$$E = (P1 - A1) - (P2 - A2)$$

Die Messung der Extinktionen wurde bei 310 nm auf einem Spektralphotometer der Firma Beckmann vorgenommen.

3.2. Bestimmung der Konzentration des Faktors VIII_{AP} mit dem Elektro-Immun-Assay, modifiziert nach Laurell (49)

Prinzip:

In die kathodennah gestanzten runden Auftragsstellen in einem Agarosegel, das eine homogene Verteilung Faktor VIII_{AP}-spezifischer Antikörper enthält, werden definierte Mengen der zu untersuchenden Proben auf-

getragen. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Antigene anodenwärts. Solange die Konzentration des Antigens größer ist als die der Antikörper bleibt die Bildung von Immunkomplexen aus. Erst nach Erreichen des Äquivalenzpunktes kommt es zur Ausbildung eines flammenförmigen Präzipitates, dessen Länge der aufgetragenen Antigenkonzentration in gewissen Grenzen proportional ist.

Methode:

In 100 ml eines Barbitalpuffers pH 8,6 0,075 mol mit Zusatz von 0,001 mol EDTA wird bei +100°C 1 g Agarose gelöst. Nach Abkühlung auf +53°C setzt man 0,7% (v/v) Antiserum zu.

Mit Hilfe von Bulldog-Klemmen, zwei fettfrei gewaschenen 10 x 10 cm großen Glasplatten und eines U-Rahmens stellt man eine Küvette von $\varnothing$ 1,5 mm Schichtdicke her, in die ca. 15 ml antiserumhaltiges Agarosegel eingefüllt werden. Ist das Gel erstarrt, löst man die Bulldog-Klemmen und hebt die obere Glasplatte vorsichtig ab. Nach Entfernen des U-Rahmens werden die Gelkanten begradigt und anschließend mit Hilfe einer 2,5 mm Teleskopstanze und einer Schablone 13 Auftragsstellen in das Gel gestanzt. Danach werden

die Platten mit den Auftragsstellen Richtung Kathode auf den Kühltisch der Elektrophoresekammer gelegt und mit in Barbitalpuffer getränkten Filterpapierstreifen die Verbindung zwischen Gel und Puffertrögen hergestellt. Zur Vermeidung einer Vordiffusion wird vor dem Auftragen der Proben der elektrische Strom eingeschaltet.

Elektrophoresebedingungen: Probevolumen 5 μ l

Barbitalpuffer pH 8,6, 0,075 mol

Feldstärke 2 - 3 Volt/cm

Temperatur +16°C

Laufzeit 18 Stunden

Sobald der Lauf beendet ist, deckt man die Gele mit zwei Lagen Filterpapier ab und trocknet sie zwei Stunden unter einem Fön. Um die noch vorhandenen, nicht präzipitierten Proteine und Salze zu entfernen, wäscht man die Gele dreimal in dest. Wasser. Nach erneuter Trocknung färbt man die Gele 60 Minuten lang mit Coomassie Brilliant Blue R-Färbelösung. Zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffes werden die Gele so lange in Entfärbelösung getaucht, bis sie fast wieder klar sind. Anschließend werden sie erneut getrocknet und mit Hilfe von Millimeterpapier ausgewertet, indem man den Abstand zwischen der Oberkante

der Auftragsstelle und der Spitze des Präzipitates mißt. Die Angabe der Werte erfolgt in arbitratischen Einheiten.

3.3. Bestimmung der Faktor-VIII-Aktivität im Einphasentest (59, 48)

Prinzip:

Der zu untersuchenden Probe wird Faktor-VIII-Mangelplasma mit einer Restaktivität $< 0,01$ WHO-Einheiten Faktor VIII_{COAG} zugesetzt und danach das endogene Gerinnungssystem durch Hinzufügen eines Oberflächenaktivators und von Phospholipiden aktiviert. Nach einer konstanten Inkubationszeit bei $+37^{\circ}\text{C}$ fügt man Calciumionen hinzu und mißt die Gerinnungszeit an einem Schnitger und Gross Koagulometer.

Methode:

0,1 ml Probe

0,1 ml Faktor-VIII-Mangelplasma

0,1 ml PTT-Reagenz (Pathromptin^(R))

inkubiert man 6 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$ und fügt anschließend

0,1 ml $2,5 \times 10^{-2}$ mol CaCl_2 -Lösung hinzu.

3.4. Bestimmung der Fibrinogenkonzentration mit Hilfe der radialen Immundiffusion (51)

Prinzip:

In die Auftragsstellen kommerziell erhältlicher Gelplatten, die eine homogene Verteilung fibrinogen-spezifischer Antikörper enthalten, werden definierte Volumina der zu untersuchenden Proben aufgetragen, die von dort aus radial in das umgebende Gel diffundieren und ein ringförmiges Präzipitat bilden, dessen Durchmesser der Fibrinogenkonzentration in gewissen Grenzen proportional ist.

Methode:

In die zwölf runden Auftragsstellen der Partigenplatten (Behringwerke) zur Bestimmung von Fibrinogen wurden jeweils 5 µl Probe pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei Raumtemperatur auf einer waagerechten Platte die Durchmesser der Präzipitatringe mit Hilfe eines Ablesegerätes der Firma Kallestad abgelesen.

Die Angabe der Werte erfolgt in arbiträren Einheiten.

3.5. Bestimmung des Einbaus von ^3_1H -Heparin und $^{14}_{12}\text{C}$ -Natrium-Citrat in den Faktor VIII

Zu 500 ml bzw. 250 ml Frischplasma wurden 0,5 μCi ^3_1H -Heparin bzw. 2,5 μCi $^{14}_{12}\text{C}$ -Natrium-Citrat zugesetzt. Die weitere Präparation des Faktors VIII erfolgte in der beschriebenen Weise (s. 4.1.).

Die Auswertung der Radioaktivität enthaltenden Fraktionen erfolgte nach Zusatz von Aquasol in einem β -Counter der Firma Packard. Nach Quench-Korrektur wurde die wiedergefundene Radioaktivität in DpM/Fraktion ermittelt. (Für die Auswertung der Versuche mit radioaktiven Substanzen danke ich Herrn PD Dr. Schnurr von der Medizinischen Klinik A der Universität Düsseldorf)

3.6. Bestimmung der Elutionskoeffizienten von Faktor VIII_{AP}, Faktor VIII_{COAG} und Fibrinogen

Die Berechnung der Elutionskoeffizienten erfolgte nach der Formel V_0/V_e . V_0 bedeutet dabei das Ausschlußvolumen der Säule und V_e das Elutionsvolumen der betreffenden Substanz. Zur Berechnung von V_e wurde von der Fraktion ausgegangen, die die maximale Konzentration des jeweiligen Proteins aufwies.

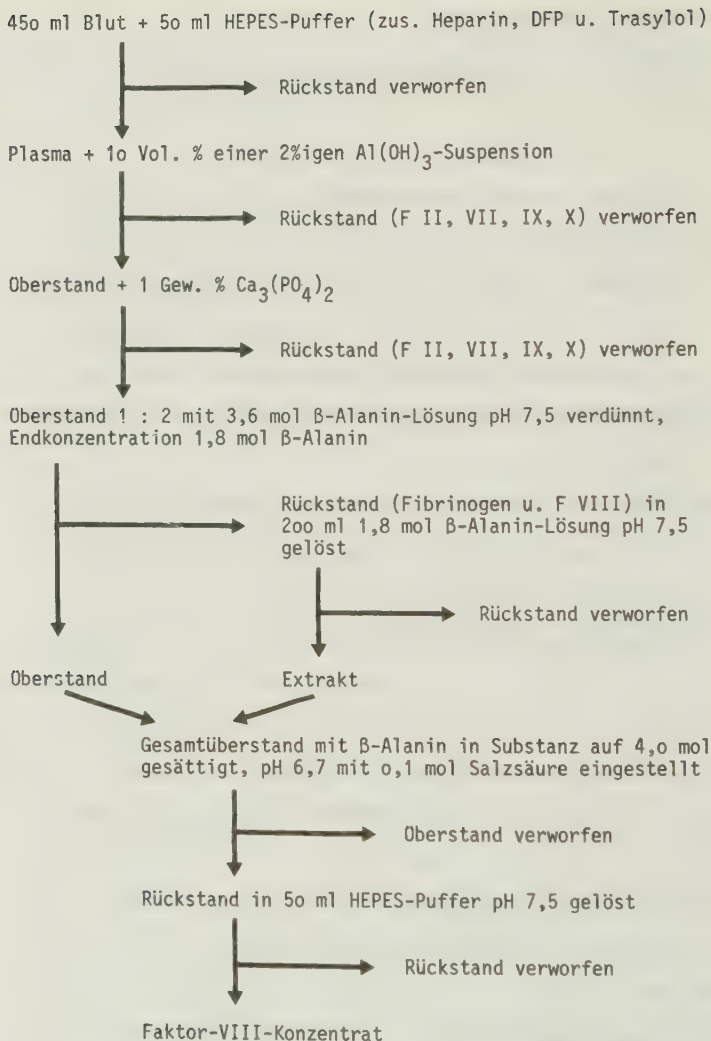
4. PRÄPARATIVE METHODEN

4.1. Herstellung eines Faktor-VIII-Konzentrates (72)

Von je zwei Blutspendern wurden je 450 ml Blut mit 50 ml HEPES-Pufferlösung versetzt, der zusätzlich unterschiedliche Mengen Heparin (500, 1.000, 10.000, 15.000 und 25.000 I.E.) zur Gerinnungshemmung sowie 0,01 g DFP und 50.000 I.E. Trasylol zur Blockade von Proteinasen zugesetzt worden waren. Das Blut wurde bei +4°C und 6.000 x g 30 Minuten lang zentrifugiert.

Das so erhaltene Plasma wurde zur Adsorption der Faktoren des Prothrombinkomplexes mit 10% (v/v) Aluminium-Hydroxid-Suspension versetzt, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach 10 Minuten bei +4°C und 7.000 x g zentrifugiert. Der Rückstand wurde verworfen, der Überstand wurde, um auch die restlichen Faktoren des Prothrombinkomplexes zu entfernen, mit 1% (g/v) Tricalciumphosphat, suspendiert in 20 ml isotoner NaCl-Lösung, adsorbiert, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten bei +4°C und 8.000 x g zentrifugiert.

Der erhaltene Überstand wurde mit der gleichen Menge einer 3,6 mol β -Alanin-Lösung pH 7,5 30 Minuten bei



Schema 2: Präparative Methode der Faktor-VIII-Isolierung aus Humanplasma (72)

+4°C zur Vorfällung des Fibrinogens gemäß TROBISCH (72) inkubiert und dann 30 Minuten bei +4°C und 10.000 x g zentrifugiert. Da bei dieser Vorfällung des Fibrinogens immer auch ein erheblicher Teil des Faktors VIII mitgefällt wird, wurde der erhaltene Rückstand in 200 ml 1,8 mol β -Alanin-Lösung pH 7,5 resuspendiert, 10 Minuten bei +4°C und 10.000 x g zentrifugiert und der resultierende Extrakt dem ersten Überstand zugesetzt. Dadurch gelang es, einen wesentlichen Teil des mitgefällten Faktors VIII zurückzugewinnen.

Der Gesamtüberstand wurde zur Fällung des Faktors VIII nach TROBISCH (72) mit β -Alanin in Substanz auf 4,0 mol gesättigt, mit 0,1 n HCl auf pH 6,7 eingestellt, 60 Minuten bei +4°C inkubiert und danach 30 Minuten bei +4°C und 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Rückstand in 50 ml HEPES-Pufferlösung pH 7,5 gelöst und dann 10 Minuten bei +4°C und 14.000 x g zentrifugiert. Der nach der Zentrifugation gewonnene Überstand stellte die Faktor-VIII-reiche Fraktion dar.

Nach jedem Schritt wurde eine Probe zur Bestimmung von Faktor VIII_{AP}, Faktor VIII_{COAG}, Fibrinogen und Eiweiß entnommen.

Bei der Isolierung des Faktors VIII aus Citratplasma wurde im ersten Schritt statt der HEPES-Pufferlösung eine 0,1 mol Na-Citrat-Citronensäure-Pufferlösung pH 4,8 benutzt, der ebenfalls DFP und Trasylol zugesetzt waren. Das radioaktiv markierte Heparin bzw. Citrat wurde dem Plasma vor dem zweiten Schritt zugesetzt.

4.2. Verteilungschromatographie

Zur Chromatographie wurde eine Pyrex^(R)-Glassäule mit den Abmessungen 5 x 75 cm benutzt, die mit 1.200 ml Sepharose 6BC1 gepackt worden war, was zugleich dem totalen Säulenvolumen entspricht. Für die Elution der aufgetragenen Faktor-VIII-Konzentrate wurde eine 0,075 mol HEPES- 0,075 mol NaCl-Pufferlösung pH 7,5 verwendet. Die Chromatographie erfolgte bei +16°C mit einer Flußgeschwindigkeit von 1,3 ml/Minute, wobei die Eluate nach Passieren eines Durchflußspektrophotometers zur Messung der Extinktion bei 280 nm mit Hilfe eines Ultrarac-Fraktionssammlers in Fraktionen zu je 10,4 ml gesammelt wurden.

5. ERGEBNISSE

Die für die chromatographischen Untersuchungen über die molekulare Masse bzw. Struktur des Gerinnungsfaktors VIII benötigten Faktor-VIII-reichen Fraktionen wurden zur Klärung des Einflusses der Art des Antikoagulans bzw. der verwendeten Antikoagulansdosis aus Heparinplasma unter Anwendung verschiedener Heparindosen und aus Citratplasma mit Hilfe der beschriebenen Aminosäurefällungsmethode mit β -Alanin hergestellt.

5.1. Fällungsverhalten des Faktors VIII bzw. des Fibrinogens bei Isolierung aus Heparin- bzw. Citratplasma

Der Faktor VIII und das Fibrinogen zeigten keine Unterschiede in ihrem Fällungsverhalten bei der Isolierung aus Heparin- und Citratplasma. Es fand sich auch keine Abhängigkeit von der benutzten Heparindosis.

5.2. Reinheit der Faktor-VIII-reichen Fraktionen

Die mit Hilfe der Aminosäurefällungsmethode mit β -Alanin hergestellten Präparationen enthielten,

unabhängig von der Art des Antikoagulans bzw. der Heparindosis, als Hauptanteil den Gerinnungsfaktor VIII daneben kontaminierende Proteine wie das kälteunlösliche β -Globulin = Fibronectin, das α_2 -Makroglobulin, das Immunglobulin M, das Fibrinogen und Spuren von Albumin.

5.3. Ergebnisse der chromatographischen Untersuchungen

5.3.1. Versuch 1 - 4:

Verteilungschromatographie von Faktor-VIII-Konzentraten aus Heparinplasma mit Zusatz von 25.000 I.E. Heparin pro 500 ml Blut (Abb.1-4)

Bei diesen Versuchen wurden die von Spendern gewonnenen 500 ml Blut jeweils mit 25.000 I.E. Heparin versetzt. Daraus wurde mit Hilfe der oben beschriebenen Fällungsmethode eine Faktor-VIII-reiche Fraktion hergestellt, die dann chromatographisch untersucht wurde. In den dabei erhaltenen Fraktionen wurde der Gehalt an Eiweiß, Faktor VIII_{AP}, Faktor VIII_{COAG} und Fibrinogen bestimmt. In allen Versuchen führten die zur Bestimmung des Eiweißgehaltes der Fraktionen verwendeten Methoden, nämlich die kontinuierliche Messung der

Extinktion bei 280 nm und die Biuretmethode, zu einem dreigipfligen Kurvenverlauf. Dabei fiel allerdings auf, daß in Versuch 1 - 3 die mit der Biuretmethode ermittelte Eiweißkonzentration der Fraktionen im Bereich des ersten Gipfels deutlich geringer ist als die Eiweißmenge, die aufgrund der Extinktionsmessung zu erwarten gewesen wäre.

Das Elutionsverhalten von Faktor VIII_{AP} ist in allen Versuchen sehr asymmetrisch, wobei die Hauptmenge im ersten Elutionspeak zu finden ist.

In Versuch 1, 2 und 4 ist Faktor VIII_{AP} aber in geringen Mengen auch noch im zweiten Gipfel nachweisbar.

Der Aktivitätsverlauf von Faktor VIII_{COAG} ist in den einzelnen Versuchen etwas unterschiedlich.

Während das Elutionsverhalten im ersten Versuch ebenfalls stark asymmetrisch ist, mit einem Aktivitätsmaximum im ersten Gipfel, finden wir im zweiten Versuch einen nahezu symmetrisch geformten Aktivitätsgipfel im Bereich des ersten Peaks. In Versuch 3 und 4 sind zwei Aktivitätsanstiege zu verzeichnen, von denen der stärkere wieder im Bereich des ersten und der kleinere im Bereich des dritten Elutionspeaks liegt.

Das Fibrinogen eluiert leicht asymmetrisch, im wesentlichen im Bereich des zweiten Gipfels. In Versuch 1 ist es auch noch zu Beginn des dritten Peaks nachweisbar. In Versuch 2 ist es in geringen Mengen auch im ersten und dritten Gipfel zu finden.

In allen Versuchen wurden folgende Elutionskoeffizienten für Faktor VIII_{AP}, Faktor VIII_{COAG} und Fibrinogen bestimmt:

	<u>Versuch 1</u>	<u>Versuch 2</u>	<u>Versuch 3</u>	<u>Versuch 4</u>
Faktor VIII _{AP}	0,96	1,0	1,04	1,0
Faktor VIII _{COAG}	0,88	1,11	1,08	1,0
Fibrinogen	0,69	0,68	0,67	0,66

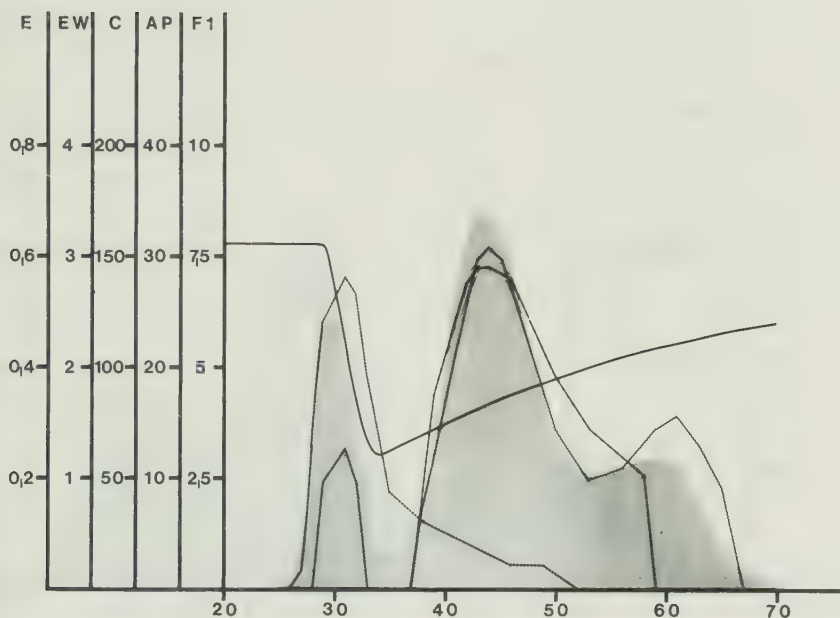


Abb. 1

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma.

Heparinkonzentration: 25.000 USP-E/500 ml Blut

Ordinate:  E = Extinktion (280 nm)

 EW = Eiweiß

 C = Faktor VIII_{COAG}

 AP = Faktor VIII_{AP}

 F1 = Fibrinogen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

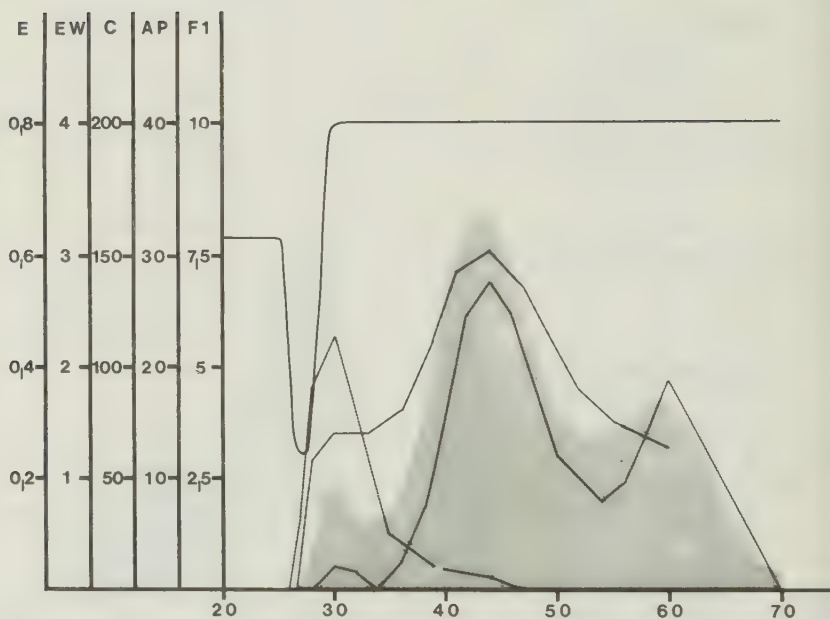
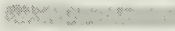


Abb.2

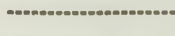
Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma.

Heparinkonzentration: 25.000 USP-E/500 ml Blut

Ordinate:  E = Extinktion (280 nm)

 EW = Eiweiß

 C = Faktor VIII_{COAG}

 AP = Faktor VIII_{AP}

 F1 = Fibrinogen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

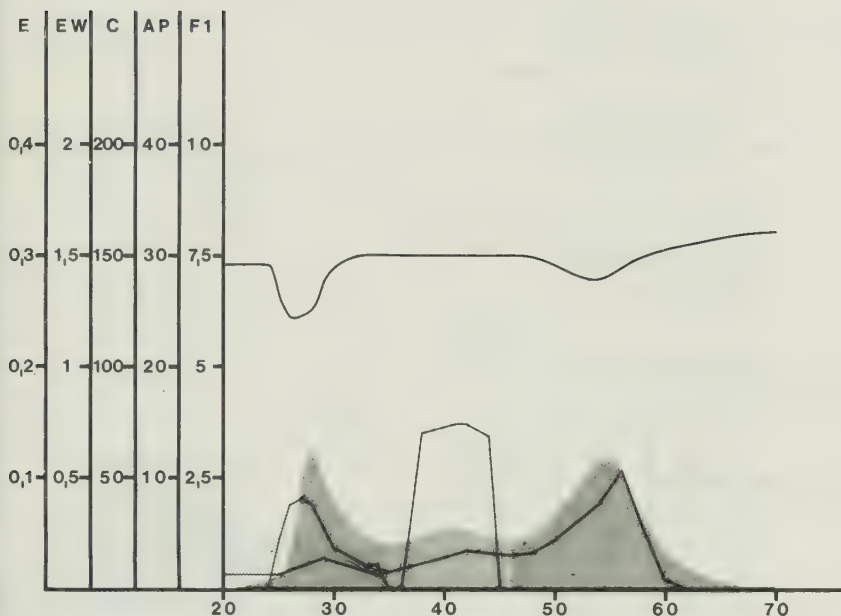


Abb.3

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma.

Heparinkonzentration: 25.000 USP-E/500 ml Blut

Ordinate: ~~Extinktion (280 nm)~~ E = Extinktion (280 nm)

~~~~~ EW = Eiweiß

———— C = Faktor VIII<sub>COAG</sub>

----- AP = Faktor VIII<sub>AP</sub>

----- F1 = Fibrinogen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

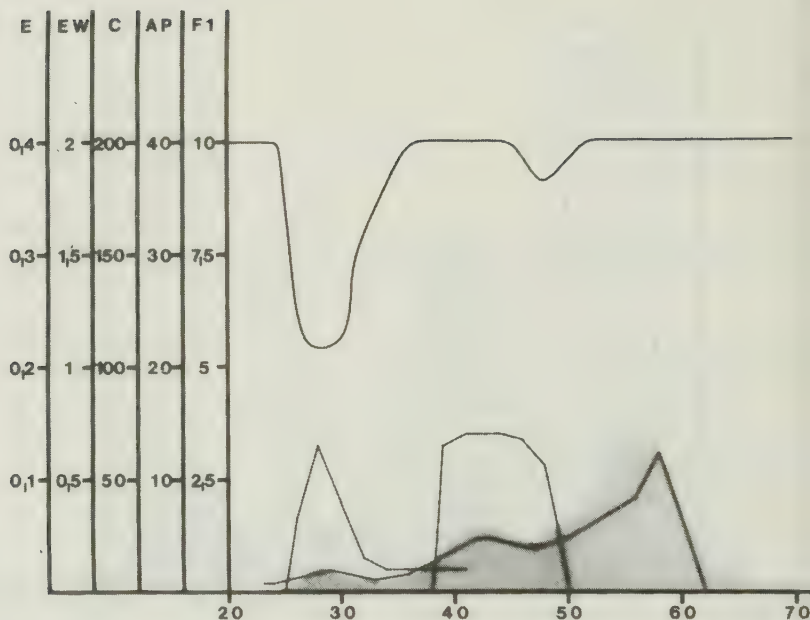


Abb.4

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma.

Heparinkonzentration: 25.000 USP-E/500 ml Blut

Ordinate: E = Extinktion (280 nm)

~~~~~ EW = Eiweiß

———— C = Faktor VIII_{COAG}

----- AP = Faktor VIII_{AP}

----- F1 = Fibrinogen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

5.3.2. Versuch 5:

Verteilungschromatographie eines Faktor-VIII-Konzentrates aus Heparinplasma mit Zusatz von 15.000 I.E. Heparin/500 ml Blut (Abb.5)

Bei diesem Versuch wurden dem Blut 15.000 I.E. Heparin zugesetzt. Die bei der Verteilungschromatographie des daraus hergestellten Faktor-VIII-Konzentrates gewonnenen Fraktionen wurden auf die gleichen Parameter untersucht wie beschrieben.

Die kontinuierliche Messung der Extinktion bei 280 nm zeigt erneut ein dreigipfliges Kurvenbild; mit der Biuretmethode ist der erste Peak nicht nachweisbar, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß hier die Mikrobiuretmethode nicht angewendet werden konnte. Faktor VIII_{AP} eluiert wieder vorwiegend im ersten Gipfel, ist aber in geringen Mengen noch bis zum Ende des zweiten Gipfels zu finden.

Der Aktivitätsverlauf von Faktor VIII_{COAG} weist zwei Aktivitätsgipfel auf; der stärkere, ziemlich symmetrisch gebaute liegt im Bereich des ersten, der zweite im Bereich des dritten Elutionspeaks.

Der Elutionsverlauf von Fibrinogen ist wieder nur leicht asymmetrisch, er tritt nur im zweiten Gipfel auf.

Für diesen Versuch wurden folgende Elutionskoeffizienten ermittelt:

| | <u>Versuch 5</u> |
|-----------------------------|------------------|
| Faktor VIII _{AP} | 1,0 |
| Faktor VIII _{COAG} | 1,04 |
| Fibrinogen | 0,69 |

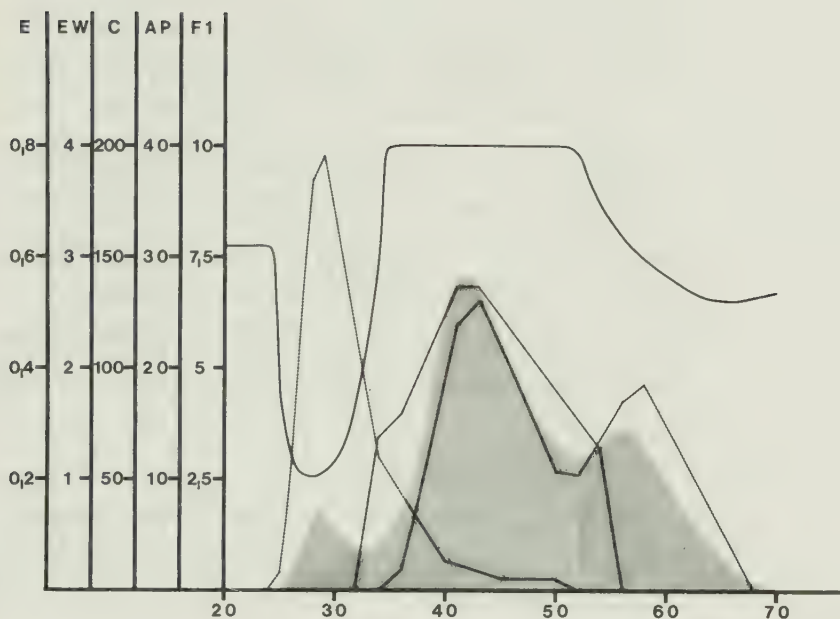


Abb.5

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma.

Heparinkonzentration: 15.000 USP-E/500 ml Blut

Ordinate:  E = Extinktion (280 nm)

 EW = Eiweiß

 C = Faktor VIII^{COAG}

 AP = Faktor VIII_{AP}

 F1 = Fibrinogen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

5.3.3. Versuch 6 und 7:

Verteilungschromatographie von Faktor-VIII-Konzentraten aus Heparinplasma mit Zusatz von 10.000 I.E. Heparin/500 ml Blut (Abb.6-7)

In beiden Versuchen führten beide Eiweißbestimmungsmethoden zu einem dreigipfligen Kurvenverlauf, bei dem wieder auffällt, daß der mit der Biuretmethode gemessene Eiweißgehalt der Fraktionen im ersten Peak erheblich niedriger ist als die Eiweißkonzentration, die aufgrund der Extinktionsmessung zu erwarten gewesen wäre.

Faktor VIII_{Ap} zeigt erneut ein sehr asymmetrisches Elutionsverhalten, bei dem die Hauptmenge sich im ersten Gipfel findet.

Auch Faktor VIII_{COAG} eluiert stark asymmetrisch, wobei das Aktivitätsmaximum im ersten Versuch zwischen dem ersten und zweiten Elutionspeak erreicht wird, während es im zweiten Versuch wieder im Bereich des ersten Gipfels liegt.

Auch das Fibrinogen eluiert im ersten Versuch etwas anders als bisher. Ein erster Konzentrationspeak findet sich im ersten Gipfel, während die Hauptmenge wieder im zweiten Peak auftritt.

Beim zweiten Versuch finden wir dann wieder das bekannte Bild eines leicht asymmetrischen Elutionsverlaufs im zweiten Peak.

Für diese beiden Versuche wurden folgende Elutionskoeffizienten berechnet:

| | <u>Versuch 6</u> | <u>Versuch 7</u> |
|-----------------------------|------------------|------------------|
| Faktor VIII _{AP} | 0,96 | 0,96 |
| Faktor VIII _{COAG} | 0,86 | 0,95 |
| Fibrinogen | 0,76 | 0,68 |

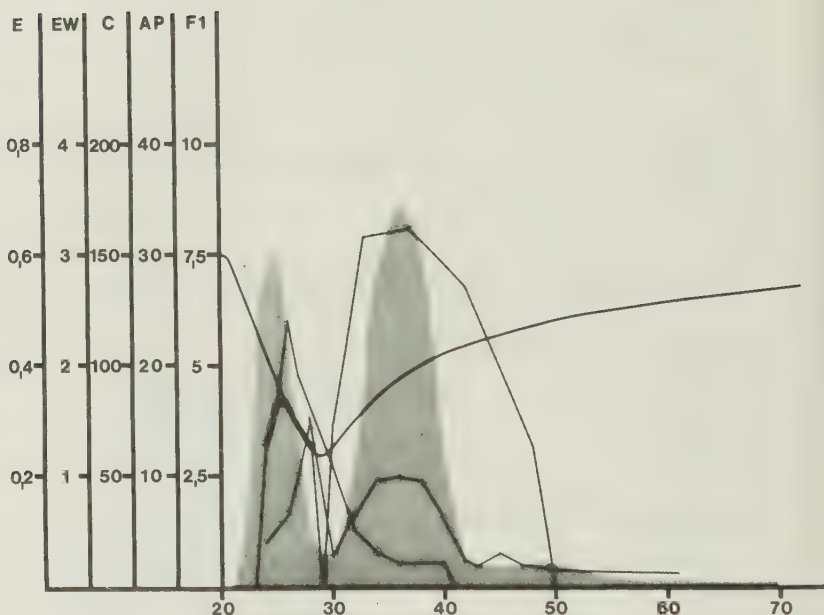


Abb.6

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma.

Heparinkonzentration: 10.000 USP-E/500 ml Blut

Ordinate:  E = Extinktion (280 nm)

 EW = Eiweiß

 C = Faktor VIII_{COAG}

 AP = Faktor VIII_{AP}

 F1 = Fibrinogen

Abzisse: Anzahl der Fraktionen

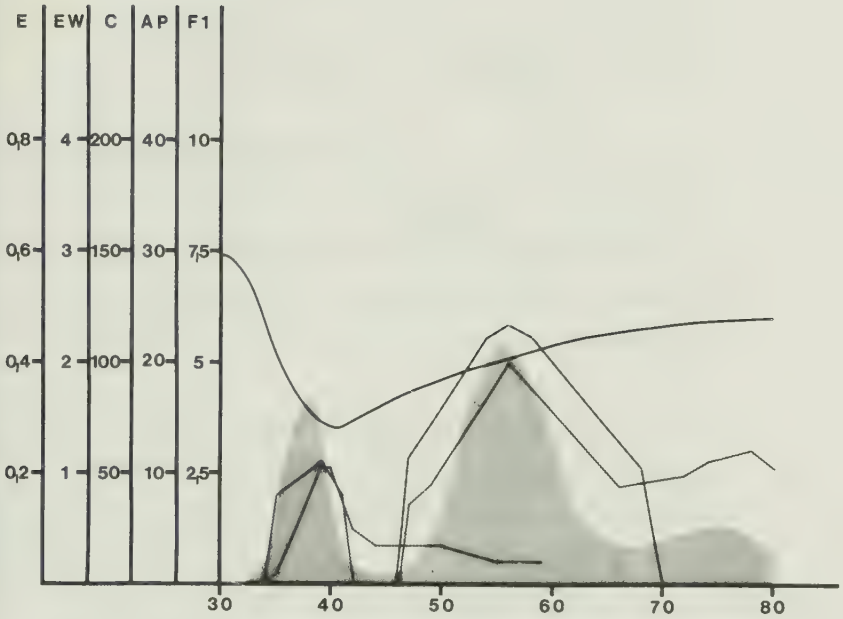


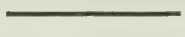
Abb. 7

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma.

Heparinkonzentration: 10.000 USP-E/500 ml Blut

Ordinate:  E = Extinktion (280 nm)

 EW = Eiweiß

 C = Faktor VIII_{COAG}

 AP = Faktor VIII_{AP}

 F1 = Fibrinogen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

5.3.4. Versuch 8 und 9:

Verteilungschromatographie von Faktor-VIII-Konzentraten aus Heparinplasma mit Zusatz von 5.000 I.E. Heparin/500 ml Blut (Abb.8-9)

Erneut ergaben beide Eiweißbestimmungsmethoden ein dreigipfliges Kurvenbild, bei dem wieder der mit der Biuretmethode ermittelte Eiweißgehalt des ersten Peaks deutlich geringer war, als aufgrund der Extinktionsmessung zu erwarten gewesen wäre.

Faktor VIII_{Ap} zeigt das schon bekannte, stark asymmetrische Elutionsverhalten, bei dem die Hauptmenge im ersten Gipfel nachzuweisen ist.

Ein unterschiedliches Bild zeigt Faktor VIII_{COAG} in den beiden Versuchen. Während wir im ersten Versuch einen stark asymmetrischen Aktivitätsverlauf finden mit dem Aktivitätsmaximum im ersten Elutionspeak, zeigen sich im zweiten Versuch zwei Aktivitätsanstiege, von denen der größere wieder im ersten Gipfel liegt und der kleinere zwischen dem zweiten und dritten Peak.

Das Fibrinogen bietet wieder das bereits bekannte, leicht asymmetrische Elutionsbild im Bereich des zweiten Gipfels.

Für die beiden Versuche wurden folgende Elutionskoeffizienten berechnet:

| | <u>Versuch 8</u> | <u>Versuch 9</u> |
|-----------------------------|------------------|------------------|
| Faktor VIII _{AP} | 1,0 | 1,04 |
| Faktor VIII _{COAG} | 0,97 | 1,0 |
| Fibrinogen | 0,67 | 0,73 |

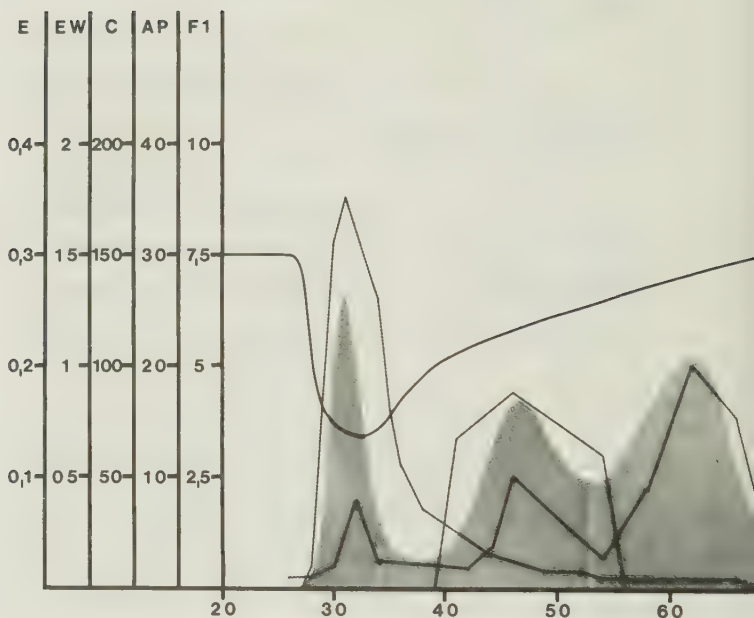


Abb.8

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reich
Fällung aus Heparinplasma.

Heparinkonzentration: 5.000 USP-E/500 ml Blut

Ordinate:  E = Extinktion (280 nm)

 EW = Eiweiß

 C = Faktor VIII_{COAG}

 AP = Faktor VIII_{AP}

 F1 = Fibrinogen

Abzisse: Anzahl der Fraktionen

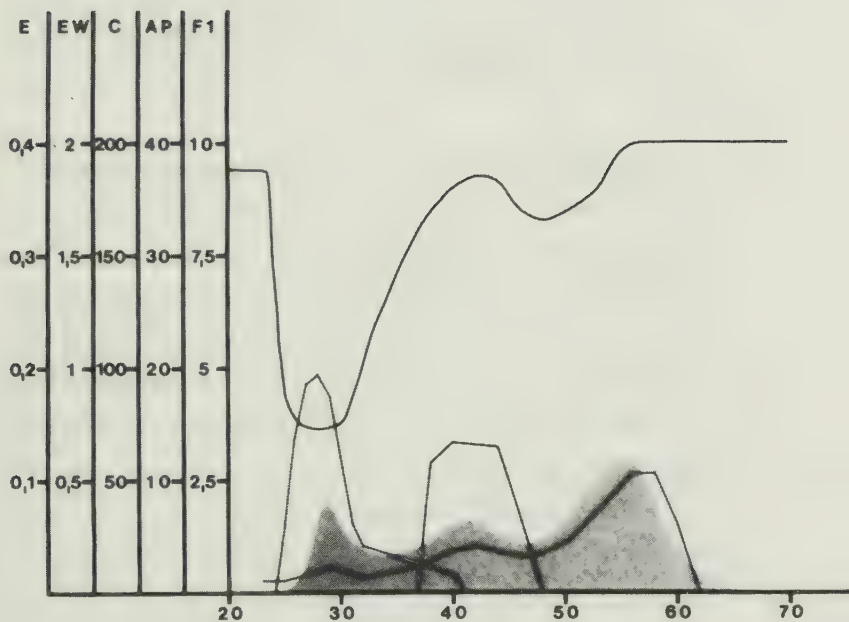


Abb.9

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma.

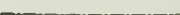
Heparinkonzentration: 5.000 USP-E/500 ml Blut

Ordinate:  E = Extinktion (280 nm)

 EW = Eiweiß

 C = Faktor VIII_{COAG}

 AP = Faktor VIII_{AP}

 F1 = Fibrinogen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

5.3.5. Versuch 10 - 12:

Verteilungschromatographie von Faktor-VIII-Konzentraten aus Heparinplasma mit Zusatz von 1.000 I.E. Heparin/500 ml Blut (Abb.10-12)

Die Anwendung der beiden Eiweißbestimmungsmethoden führte jeweils zu einem dreigipfligen Kurvenbild. Dabei bestehen zwischen den einzelnen Versuchen allerdings erhebliche Unterschiede. Während im ersten Versuch die mit der Biuretmethode bestimmten Eiweißkonzentrationen sämtlicher Fraktionen deutlich niedriger sind als die aufgrund der Extinktionsmessung zu erwartenden Werte, decken sie sich im dritten Versuch in etwa. Im zweiten Versuch finden wir dagegen wieder die schon bekannte Diskrepanz im Bereich des ersten Peaks. Der Elutionsverlauf von Faktor VIII_{AP} ist in allen Versuchen erneut sehr asymmetrisch. Die Hauptmenge tritt dabei im ersten Gipfel auf. In den beiden ersten Versuchen eluiert auch Faktor VIII_{COAG} sehr asymmetrisch, mit einem Aktivitätsmaximum im Bereich des ersten Elutionsgipfels; im dritten Versuch finden wir dagegen zwei Aktivitätsanstiege, von denen der ausgeprägtere wieder im Bereich des ersten, der schwächere im Bereich des dritten Peaks liegt.

Das Fibrinogen zeigt den üblichen, leicht asymmetrischen Elutionsverlauf im Bereich des zweiten Gipfels, im ersten Versuch ist es, allerdings in geringen Mengen, auch im ersten und dritten Peak zu finden.

Für diese Versuche wurden folgende Elutionskoeffizienten ermittelt:

| | <u>Versuch 10</u> | <u>Versuch 11</u> | <u>Versuch 12</u> |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Faktor VIII _{AP} | 0,96 | 0,94 | 1,0 |
| Faktor VIII _{COAG} | 1,04 | 0,93 | 1,0 |
| Fibrinogen | 0,70 | 0,63 | 0,65 |

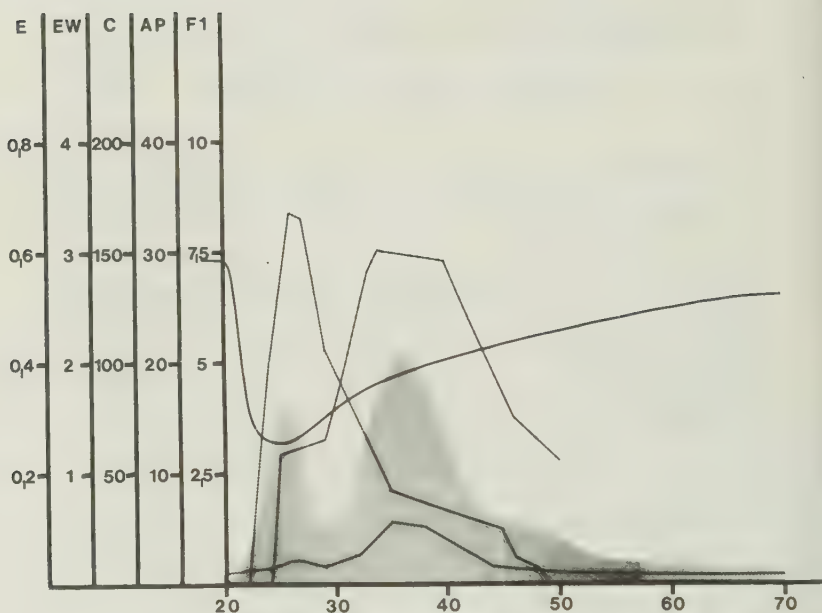


Abb.10

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma.

Heparinkonzentration: 1.000 USP-E/500 ml Blut

Ordinate: [] E = Extinction (280 nm)

~~~~~ EW = Eiweiß

———— C = Faktor VIII<sub>COAG</sub>

..... AP = Faktor VIII<sub>AP</sub>

— · — · — F1 = Fibrinogen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

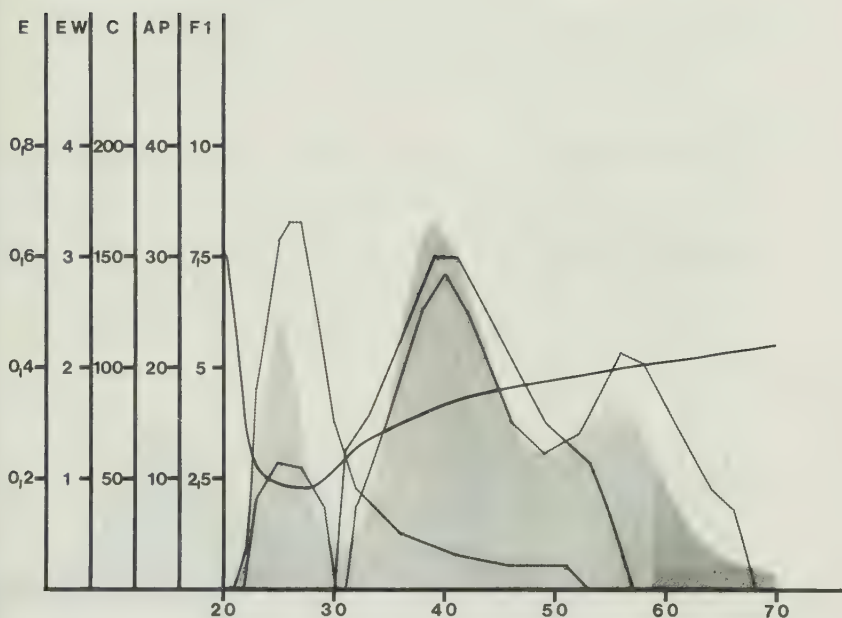
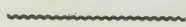


Abb. 11

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma.

Heparinkonzentration: 1.000 USP-E/500 ml Blut

Ordinate:  E = Extinction (280 nm)

 EW = Eiweiß

 C = Faktor VIII<sub>COAG</sub>

 AP = Faktor VIII<sub>AP</sub>

 F1 = Fibrinogen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

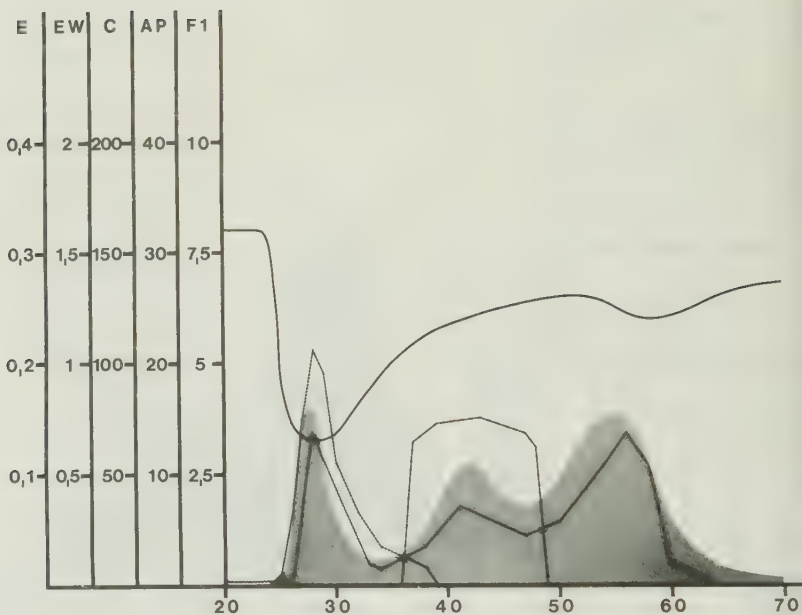
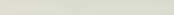


Abb.12

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma.

Heparinkonzentration: 1.000 USP-E/500 ml Blut

Ordinate:  E = Extinktion (280 nm)

-  EW = Eiweiß
-  C = Faktor VIII<sub>COAG</sub>
-  AP = Faktor VIII<sub>AP</sub>
-  F1 = Fibrinogen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

6. Versuch 13 und 14:

Verteilungschromatographie von Faktor-VIII-Konzentraten aus Heparinplasma mit Zusatz von 500 I.E. Heparin/500 ml Blut (Abb.13-14)

In diesen Versuchen wurde bei der Blutabnahme diejenige Menge Heparin zugesetzt, die gerade noch ausreicht, die Blutgerinnung zu verhindern. Anschließend wurden mit der oben beschriebenen Methode Faktor-VIII-reiche Fraktionen hergestellt und chromatographisch untersucht.

Erneut führte die kontinuierliche Messung der Extinktion bei 280 nm zur Bestimmung des Eiweißgehaltes zu einem dreigipfligen Kurvenverlauf, der sich beim ersten Versuch auch mit der Biuretmethode nachweisen läßt, wobei allerdings der ermittelte Eiweißgehalt in allen Fraktionen erheblich niedriger ist als nach der Extinktionsmessung zu erwarten gewesen wäre.

Beim zweiten Versuch dagegen ist der erste Peak mit der Biuretmethode nicht nachweisbar; allerdings konnte hier die Mikrobiuretmethode nicht angewendet werden. Faktor VIII<sub>Ap</sub> eluierte stark asymmetrisch, die Hauptmenge fand sich dabei im ersten Elutionsgipfel.

Auch der Aktivitätsverlauf von Faktor VIII<sub>COAG</sub> war wieder sehr asymmetrisch mit dem Aktivitätsmaximum im Bereich des ersten Peaks.

Das Fibrinogen zeigte den üblichen, leicht asymmetrischen Konzentrationsverlauf im Bereich des zweiten Gipfels.

Folgende Elutionskoeffizienten wurden für diese Versuche berechnet:

|                             | <u>Versuch 13</u> | <u>Versuch 14</u> |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| Faktor VIII <sub>AP</sub>   | 0,91              | 0,99              |
| Faktor VIII <sub>COAG</sub> | 0,91              | 0,97              |
| Fibrinogen                  | 0,68              | 0,69              |

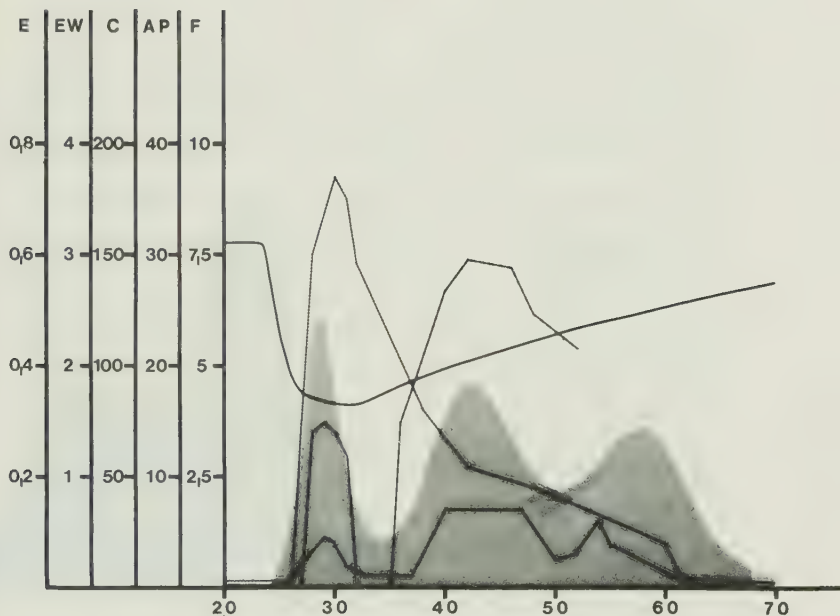


Abb.13

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma.

Heparinkonzentration: 500 USP-E/500 ml Blut

Ordinate: E = Extinktion (280 nm)

EW = Eiweiß

C = Faktor VIII<sub>COAG</sub>

AP = Faktor VIII<sub>AP</sub>

F1 = Fibrinogen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

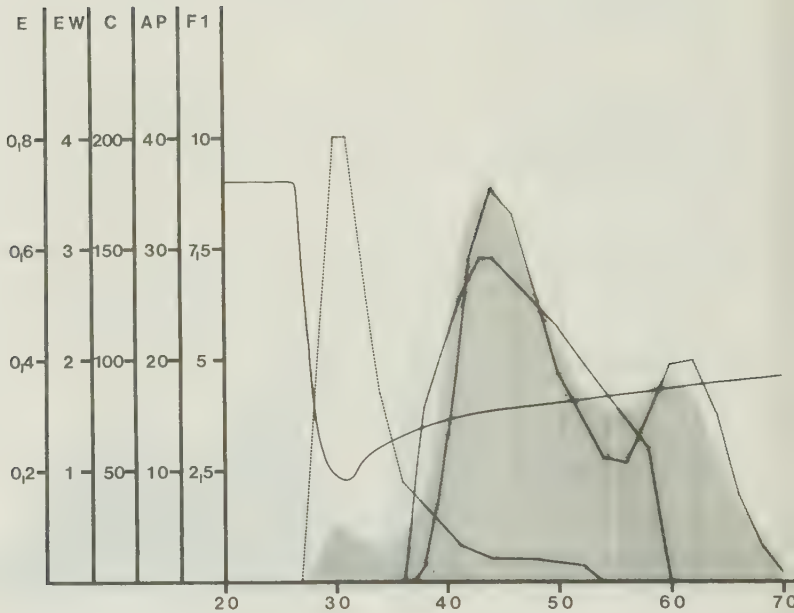


Abb. 14

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma.

Heparinkonzentration: 500 USP-E/500 ml Blut

Ordinate: ~~Extinktion (280 nm)~~ E = Extinktion (280 nm)

~~~~~ EW = Eiweiß

———— C = Faktor VIII_{COAG}

----- AP = Faktor VIII_{AP}

- · - · - F1 = Fibrinogen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

3.7. Rechromatographie der Faktor-VIII_{AP}-reichsten
Fraktion einer Verteilungschromatographie (Abb.15)

Um festzustellen, ob das bei allen bisher durchgeführten Chromatographien zu beobachtende stark asymmetrische Elutionsverhalten von Faktor VIII_{AP} bzw. Faktor VIII_{COAG} auf einer breiten Streuung der molekularen Masse beruht oder auf einer Reaktion des Moleküls mit der Gelmatrix, wurde die Faktor-VIII-reichste Fraktion einer Verteilungschromatographie noch einmal chromatographiert. Die kontinuierliche Messung der Extinktion bei 280 nm ergab wieder ein dreigipfliges Kurvenbild. Faktor VIII_{AP} eluierte nur noch leicht asymmetrisch im Bereich des ersten Gipfels. Im Gegensatz dazu blieb der Aktivitätsverlauf von Faktor VIII_{COAG} weiter sehr asymmetrisch, mit dem Aktivitätsmaximum im ersten Peak.

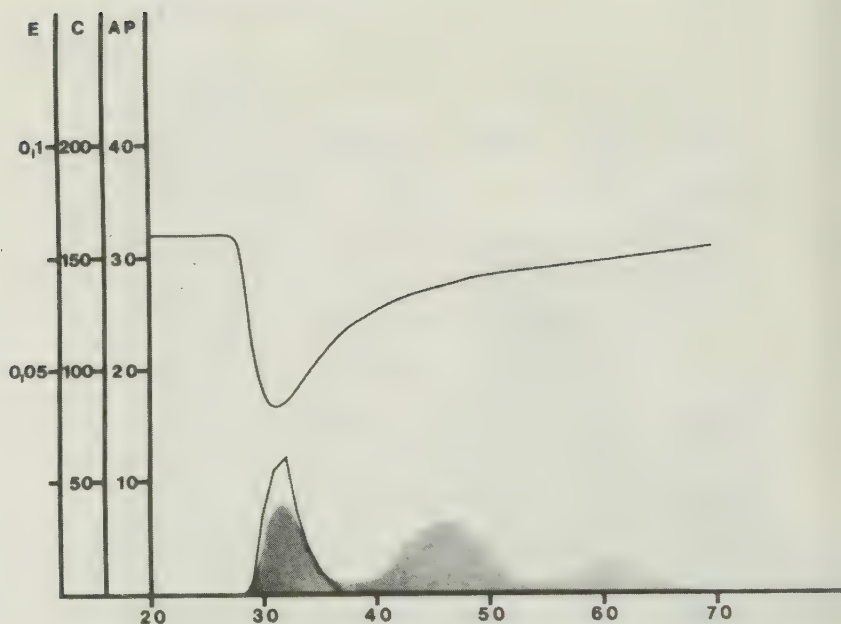


Abb. 15

Ergebnisse der Rechromatographie einer hochreinen Faktor-VIII-Präparation.

Ordinate:  E = Extinktion (280 nm)
 C = Faktor VIII_{COAG}
 AP = Faktor VIII_{AP}

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

3.8. Verteilungschromatographie eines Faktor-VIII-Konzentrates aus Heparinplasma mit Zusatz von ^3_1H -Heparin (Abb.16)

Da bei allen bisher durchgeführten Versuchen trotz der erheblichen Unterschiede in der zugesetzten Heparindosis keine Änderung im Erscheinungsbild von Faktor VIII_{AP} bzw. Faktor VIII_{COAG} feststellbar war, versuchten wir mit Hilfe von radioaktiv markiertem Heparin herauszufinden, ob das Heparin überhaupt mit dem Faktor VIII reagierte bzw. sich an ihn anlagerte. Zu diesem Zweck wurde bei der Herstellung einer Faktor-VIII-reichen Fraktion dem Plasma 0,5 μCi ^3_1H -Heparin zugesetzt. Die bei der unter den üblichen Bedingungen durchgeführten Chromatographie gewonnenen Fraktionen wurden mit Hilfe eines β -Counters auf ihren Radioaktivitätsgehalt untersucht. Zum Vergleich wurde dann das ^3_1H -Heparin allein chromatographiert. Die Extinktionsmessung ergab erneut das typische dreigipflige Kurvenbild. Faktor VIII_{AP} erschien wieder mit der Hauptmenge im ersten Gipfel, war aber noch in der Mitte des zweiten Peaks in geringer Menge nachweisbar.

Das Fibrinogen eluierte leicht asymmetrisch an typischer Stelle.

Erstaunlicherweise zeigte auch der Radioaktivitätsverlauf ein dreigipfliges Bild, bei dem die beiden ersten Gipfel genau den Faktor-VIII_{AP}- bzw. Fibrinogen-peak nachzeichneten, während der dritte Gipfel dort auftrat, wo das Heparin in Abwesenheit von Proteinen eluiert, wie wir mit der Chromatographie von ^3_1H -Heparin zeigen konnten.

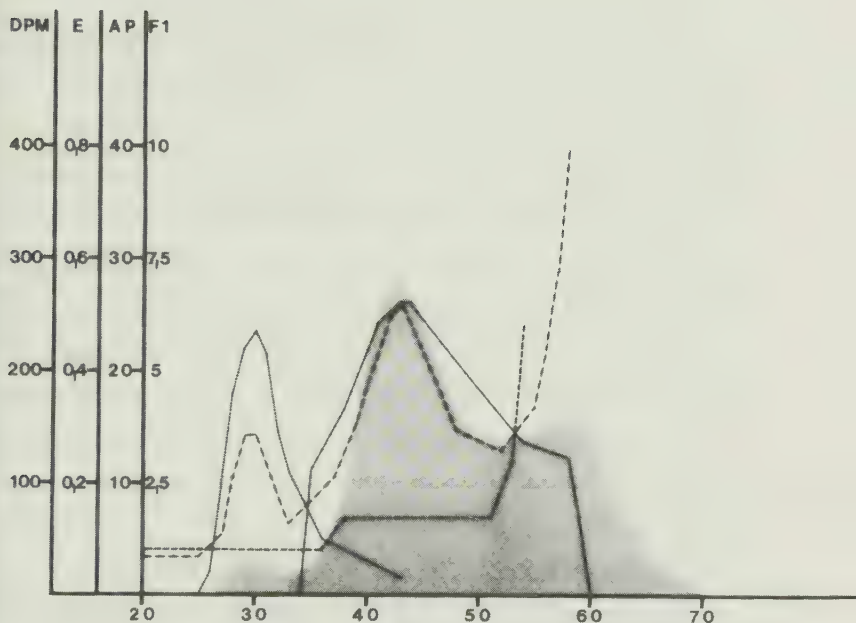


Abb.16

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Heparinplasma, dem ^3_1H -Heparin zugesetzt wurde.

Heparinkonzentration: 20.000 USP-E/500 ml Blut

Aktivität des markierten Heparins: 95 μCi

Ordinate:

- — — — — DPM (Dosis/Minute) des ^3_1H -Heparins bei der Verteilungschromatographie von Faktor VIII
- - - - - DPM des ^3_1H -Heparins
- ■ ■ ■ ■ E = Extinktion (280 nm)
- AP = Faktor VIII_{AP}
- F1 = Fibrinogen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

5.3.9. Verteilungschromatographie eines Faktor-VIII-

Konzentrates aus Citratplasma mit Zusatz von $^{14}_{12}\text{C}$ -Citrat
(Abb.17)

Als Vergleich zu den Versuchen mit Faktor-VIII-Konzentraten aus Heparinplasma wurde eine Faktor-VIII-reiche Fraktion aus Citratplasma hergestellt und danach chromatographisch untersucht. Durch den Zusatz von 2,5 μCi $^{14}_{12}\text{C}$ -Citrat, das auch in Abwesenheit von Proteinen chromatographiert wurde, zum Plasma sollte auch die Frage geklärt werden, ob sich Citrat ebenfalls an den Faktor VIII anlagert. Die Auswertung der radioaktiven Fraktionen erfolgte wieder mit einem β -Counter.

Die Messung der Extinktion bei 280 nm führte auch bei diesem Versuch zu einem dreigipfligen Kurvenverlauf. Faktor VIII_{AP} eluierte hauptsächlich innerhalb des ersten Gipfels, war aber auch noch zu Beginn des zweiten Peaks zu finden.

Der Aktivitätsverlauf von Faktor VIII_{COAG} wies wieder zwei Aktivitätsgipfel auf, von denen allerdings diesmal der höhere mit dem Aktivitätsmaximum zwischen dem zweiten und dritten und der kleinere im Bereich des ersten Elutionspeaks lag. Beide waren nur leicht asymmetrisch gebaut.

Das Fibrinogen zeigte den typischen, leicht asymmetrischen Konzentrationsverlauf im zweiten Gipfel. Die Radioaktivitätsmessung erbrachte keinen Unterschied im Vergleich zur alleinigen Chromatographie von $^{14}_{12}\text{C}$ -Citrat, d.h., daß $^{14}_{12}\text{C}$ -Citrat weder in den Faktor-VIII_{Ap}-haltigen noch in den Fibrinogen-haltigen Fraktionen nachgewiesen werden konnte.

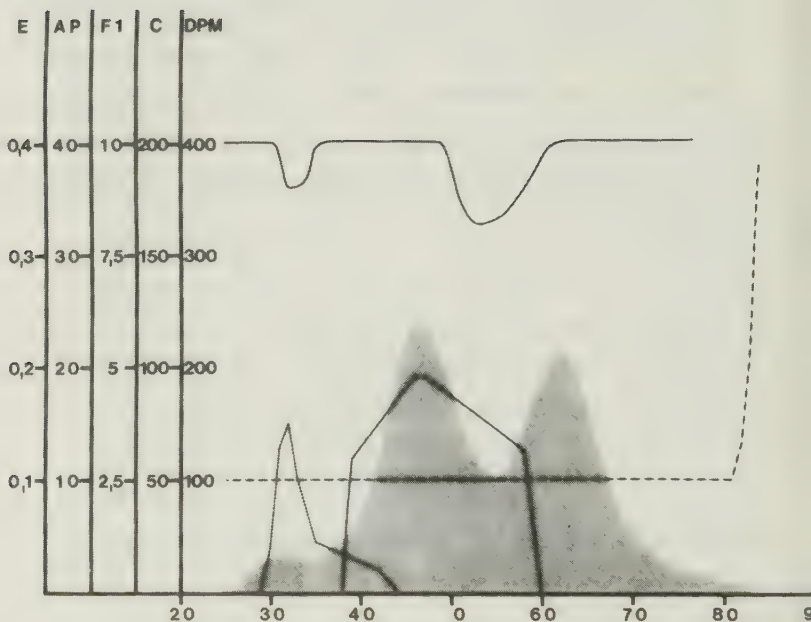


Abb.17

Ergebnisse der Verteilungschromatographie einer Faktor-VIII-reichen Fällung aus Citratplasma, dem ^{14}C -Citronensäure zugesetzt wurde.

Antikoagulans: 0,1 mol Na-Citrat-Citronensäure-Puffer pH 4,8

Aktivität der markierten Citronensäure: 2,5 μCi

Ordinate:
 - - - - - DPM (Dosis/Minute) der ^{14}C -Citronensäure
 [shaded area] E = Extinktion (280 nm)
 - - - - - AP = Faktor VIII_{AP}
 ————— C = Faktor VIII_{COAG}
 ————— F1 = Fibrinogen

6. DISKUSSION

Die für die durchgeführten Untersuchungen benötigten Faktor-VIII-Konzentrate wurden mit Hilfe einer Aminosäurenfällung mit β -Alanin aus Heparin- bzw. Citratplasma hergestellt. Diese Methode, die von TROBISCH entwickelt worden ist (72), bot die Möglichkeit einer schonenden Fällung des Faktors VIII und einer gleichzeitigen partiellen Reinigung von kontaminierenden Proteinen. Vor allem konnten große Teile des Fibrinogens durch eine Vorfällung entfernt werden.

Aus mehreren Gründen mußte die Fällungstechnik modifiziert werden.

- 1.) Es wurde ein zusätzlicher Adsorptionsschritt für die Faktoren des Prothrombinkomplexes mit $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ eingeführt, da es sich gezeigt hatte, daß die Adsorption an $\text{Al}(\text{OH})_3$ nicht ausreichend war.
- 2.) Zur Verhinderung einer proteolytischen Degradation des Faktors VIII durch Serylproteasen wurden den Plasmen Diisopropylfluorophosphat und Aprotinin zugesetzt.
- 3.) Heparin wurde anstatt Citrat als Antikoagulans verwendet.

Auf die Bedeutung kontaminierender endogener Enzyme (Proteasen) auf die Struktur des Faktors VIII wurde von mehreren Autoren hingewiesen (3, 8, 25, 26). Es bleibt allerdings fraglich, ob durch den Zusatz von DFP und Trasylol eine enzymatische Spaltung des Faktors VIII völlig verhindert werden kann, denn während BECK berichtete, daß durch die Anwendung von Trasylol die Dissoziation des Faktors VIII in einen hoch- und einen niedermolekularen Bestandteil bei hoher Ionenstärke verhindert werden kann (8), wurde von STEAD berichtet, daß weder DFP noch Trasylol die Zerstörung von Faktor VIII_{COAG} verhindern können (67).

Die Benutzung von Heparin ergab, im Vergleich zur Isolierung aus Citratplasma keinen Unterschied im Fällungsverhalten des Fibrinogens oder der Reinheit des Endproduktes. Beide Parameter zeigten auch keinerlei Abhängigkeit von der Menge des zugesetzten Heparins. Die das Faktor-VIII-Konzentrat verunreinigenden Proteine entsprechen denen, die auch von TROBISCH gefunden wurden (72). Diese Verunreinigungen wurden auch in den Ergebnissen der Verteilungschromatographien deutlich, bei denen sowohl die kontinuierliche Extinktionsmessung bei 280 nm als auch die Bestimmung

des Eiweißgehaltes der gewonnenen Fraktionen mit Hilfe der Biuretmethode immer einen dreigipfligen Kurvenverlauf ergab.

Der erste Peak wird dabei vom Faktor VIII gebildet, während im zweiten Gipfel das Fibrinogen zu finden ist. Hier dürften aber auch aufgrund ihres Molekulargewichtes das hälteunlösliche β -Globulin, das α_2 -Makroglobulin und das Immunglobulin M nachzuweisen sein. Der dritte Peak schließlich wird vom Albumin gebildet.

Besonders auffällig war die völlig unabhängig von der verwendeten Heparindosis und auch nach Isolierung aus Citratplasma zu beobachtende Diskrepanz in den Ergebnissen der Extinktionsmessung bei 280 nm und der Biuretmethode im Bereich des ersten Gipfels. Ein Einfluß des Heparins muß aufgrund der Dosisunabhängigkeit der Ergebnisse und der Tatsache, daß der gleiche Befund auch nach einer Isolierung aus Citratplasma auftrat, wohl als ausgeschlossen angesehen werden. Daher ist diese Diskrepanz wohl der Ausdruck eines sehr hohen Anteils der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan am Aufbau des Faktors VIII. Diesem Ergebnis widersprechen allerdings die Werte, die bei Aminosäureanalysen des Faktors VIII durch

HERSHGOLD bzw. SHAPIRO erhalten wurden. Beide ermittelten einen geringeren Gehalt an aromatischen Aminosäuren als er normalerweise in Proteinen vorhanden ist (33, 65).

Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist in den Unterschieden im Reinheitsgrad und in der Herstellungsweise der Faktor-VIII-Konzentrate zu suchen.

Das Elutionsverhalten von Faktor VIII_{AP} war in allen Verteilungschromatographien ausgesprochen asymmetrisch. Aus diesem Grunde wurde die Faktor-VIII_{AP}-reichste Fraktion einer Rechromatographie unterzogen, um festzustellen, ob die Ursache eine Reaktion des Faktors VIII_{AP} mit der Gelmatrix sein könnte.

Eine Einwirkung des Heparins als mögliche Erklärung hierfür kann ausgeschlossen werden, da einerseits dieses Phänomen völlig unabhängig von der benutzten Heparindosis auftrat und andererseits auch bei einer vergleichenden Chromatographie eines Faktor-VIII-Konzentrates aus Citratplasma beobachtet werden konnte. Die Rechromatographie ergab ein nur noch schwach asymmetrisches Elutionsbild, was auf eine schwache Reaktion von Faktor VIII_{AP} mit der Gelmatrix

in Form von hydrophoben Bindungen hindeutet. Dies reicht aber nicht aus, um die vorher festgestellte starke Asymmetrie im Elutionsverhalten zu erklären. Hier muß vielmehr eine breite Streuung der Molekularmasse des Faktors VIII angenommen werden. Diese läßt sich sehr leicht durch den von mehreren Untersuchern festgestellten Aufbau aus einer unterschiedlichen Zahl homologer Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, und deren molekulare Masse etwa 2×10^5 daltons beträgt, erklären (30, 52, 53, 65, 68). Die Hauptmasse von Faktor VIII_{AP} fand sich allerdings immer völlig unabhängig von der verwendeten Heparindosis im Bereich des Ausschlußvolumens, wie aus den Elutionskoeffizienten hervorgeht (Tab.1).

Auch Faktor VIII_{COAG} eluierte bei allen Verteilungschromatographien sehr asymmetrisch, wobei auch hier die Elutionskoeffizienten keine Abhängigkeit von der Heparindosis erkennen ließen, und das Aktivitätsmaximum stets mit dem Faktor-VIII_{AP}-Gipfel zusammenfiel (Tab.1). Im Gegensatz zu Faktor VIII_{AP} ergab hier auch die Rechromatographie ein ausgesprochen asymmetrisches Elutionsverhalten, was auf eine starke

Bindung von Faktor VIII_{COAG} an die Gelmatrix schließen läßt. Dieser Befund erklärt allerdings nicht den manchmal unabhängig von der verwendeten Heparindosis auftretenden zweiten Aktivitätsgipfel im Bereich des dritten Elutionspeaks. Eine Einwirkung des Heparins kann auch hier ausgeschlossen werden, da er sich auch bei der vergleichenden Verteilungschromatographie eines Faktor-VIII-Konzentrates nach Isolierung aus Citratplasma findet. Es muß vielmehr davon ausgegangen werden, daß es sich hier um in geringen Mengen im Plasma vorkommenden "freien" Faktor VIII_{COAG} handelt. Mit dieser Vorstellung eines isoliert vorkommenden Faktor VIII_{COAG} würden sich viele von anderen Untersuchern erhobene Befunde decken:

- 1.) In den Endothelzellen der Gefäße konnte nur die Synthese von Faktor VIII_{AP}, nicht aber von Faktor VIII_{COAG} nachgewiesen werden (15, 40, 41, 42, 43).
- 2.) Faktor VIII_{COAG} konnte dagegen in Nierenhomogenisaten und Leukocyten nachgewiesen werden (6, 12).

3.) Bei Anwendung von Lösungen mit hoher Salzkonzentration erfolgt eine Dissoziation des Faktors VIII in einen hochmolekularen Bestandteil mit Faktor VIII_{AP} und Faktor VIII_{VWF} aber ohne Faktor VIII_{COAG} und einen niedermolekularen Bestandteil mit Faktor VIII_{COAG} aber ohne Faktor VIII_{AP} und Faktor VIII_{VWF}, die durch hydrophobe Bindungen miteinander verbunden sind (20, 21, 58, 60, 62).

Aufgrund dieser vorliegenden Ergebnisse ist ein Aufbau des Faktors VIII aus zwei unterschiedlichen Proteinen anzunehmen, die an verschiedenen Stellen des Körpers synthetisiert werden und sich erst im strömenden Blut zusammenlagern. Das eine Protein besitzt eine kleine Molekularmasse (ca. 60.000 daltons) und ist für die Gerinnungsaktivität des Faktors VIII verantwortlich. Das andere Protein hat im Vergleich dazu eine große Molekularmasse und besteht neben der von Willebrand-Aktivität aus dem Faktor VIII_{AP}. Der hochmolekulare Bestandteil wiederum ist aus einer unterschiedlichen Zahl identischer Untereinheiten aufgebaut, die über Disulfidbrücken miteinander ver-

bunden sind. Die nieder- und hochmolekularen Bestandteile sind über hydrophobe Bindungen miteinander verbunden, wobei die Anzahl der Bindungsstellen für Faktor VIII_{COAG} mit zunehmender Größe des hochmolekularen Bestandteils wächst. Dieses Strukturmodell des Faktors VIII steht mit den von ZIMMERMANN festgestellten multiplen molekularen Formen des Faktors VIII im Plasma in ausgezeichneter Übereinstimmung (81). Im Gegensatz dazu stehen die Befunde von McKEE und SWITZER, nach denen der Faktor VIII aus homologen Untereinheiten aufgebaut ist, die alle dem Faktor VIII zugeschriebenen Aktivitäten besitzen (52, 53, 68).

| Heparindosis | Elutionskoeffizienten von | | |
|--------------|---------------------------|------------------------|------|
| | F VIII _{AP} | F VIII _{COAG} | F I |
| 25.000 I.E. | 1,00 | 1,02 | 0,68 |
| 15.000 I.E. | 1,00 | 1,04 | 0,69 |
| 10.000 I.E. | 0,96 | 0,91 | 0,72 |
| 5.000 I.E. | 1,02 | 0,99 | 0,70 |
| 1.000 I.E. | 0,97 | 0,97 | 0,66 |
| 500 I.E. | 0,95 | 0,94 | 0,69 |

Tab.1: Die mittleren Elutionskoeffizienten von Faktor VIII_{AP}, Faktor VIII_{COAG} und Fibrinogen in Abhängigkeit von der Heparindosis.

Das Fibrinogen eluierte in allen Experimenten ziemlich symmetrisch. Eine Abhängigkeit von der benutzten Heparindosis ließ sich, wie aus den Elutionskoeffizienten hervorgeht, nicht erkennen (Tab.1).

Das Protein fand sich jedesmal im Bereich des zweiten Elutionspeaks, wobei sich auch kein Unterschied zwischen der Isolierung aus Heparin- bzw. Citratplasma ergab. Von daher kann eine Einwirkung des Antikoagulans auf die Struktur des Fibrinogens ebenso ausgeschlossen werden wie eine Wechselwirkung mit der Gelmatrix.

Die mit radioaktiv markierten Antikoagulantien durchgeführten chromatographischen Untersuchungen wiesen im Gegensatz zu den bisher erhaltenen Ergebnissen auf erhebliche Unterschiede im Verhalten von Heparin und Citrat in Bezug auf den Faktor VIII bzw. das Fibrinogen hin. Das radioaktiv markierte Citrat zeigte sowohl bei der alleinigen Chromatographie als auch bei der Verteilungschromatographie eines Faktor-VIII-Konzentrates, das unter Verwendung dieses Antikoagulans hergestellt worden war, das gleiche Elutionsbild, was auf das Fehlen einer Reaktion mit dem Faktor VIII oder Fibrinogen hinweist. Im Gegensatz dazu zeichnete

das radioaktiv markierte Heparin bei der Verteilungs-
chromatographie eines Faktor-VIII-Konzentrates so-
wohl den Faktor-VIII_{AP}- als auch den Fibrinogengipfel
genau nach und trat damit an Positionen in Erscheinung,
an denen es aufgrund seiner Molekularmasse und des
Elutionsverhaltens bei alleiniger Chromatographie
nicht zu erwarten gewesen wäre. Das deutet auf eine
Anlagerung des Heparins an Faktor VIII_{AP} und Fibrinogen
hin. Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da bisher nur
eine Komplexbildung des Heparins mit Antithrombin III
bekannt ist (32, 64, 71).

Da sich bei den Verteilungschromatographien keine Ver-
änderungen in der Molekularmasse bzw. -struktur des
Faktors VIII in Abhängigkeit von der Heparindosis
zeigten, hat sich durch die Anlagerung des Heparins
möglicherweise nur der isoelektrische Punkt des
Faktors VIII geändert. Dieser Frage wurde hier je-
doch nicht weiter nachgegangen.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von chromatographischen Untersuchungen versucht, Erkenntnisse über die Molekularstruktur des Faktors VIII zu gewinnen. Bei der Isolierung des Faktors VIII aus Humanplasma wurde Heparin als Antikoagulans verwendet, um durch einen Vergleich mit der Isolierung des Faktors VIII aus Citratplasma herauszufinden, ob das Antikoagulans die Ergebnisse beeinflusst. Durch Verwendung verschiedener Heparindosen sollte gleichzeitig geklärt werden, ob die Konzentration des Antikoagulans einen Einfluß ausübt.

1. Die Herstellung der für die Untersuchungen benötigten Faktor-VIII-Konzentrate erfolgte mit Hilfe einer Aminosäurenfällungsmethode mit β -Alanin, die die Möglichkeit bot, durch eine Vorfällung einen großen Teil des Fibrinogens zu entfernen. Dabei traten weder im Fällungsverhalten des Faktors VIII noch des Fibrinogens Unterschiede zwischen der Isolierung aus Heparin- und Citratplasma auf. Es fand sich auch keine Abhängigkeit von der benutzten Heparindosis. Das Faktor-VIII-Konzentrat enthielt außer Fibrinogen weitere kontaminierende Proteine wie das Kälteun-

lösliche Globulin-Fibronectin, das Immunglobulin M, das α_2 -Makroglobulin und Albumin.

- 7.2. Diese kontaminierenden Proteine führten bei der Verteilungschromatographie in der kontinuierlichen Extinktionsmessung bei 280 nm zu einem dreigipfligen Kurvenverlauf. Der hochmolekulare Peak wird dabei vom Faktor VIII gebildet, der niedermolekulare vom Albumin, während sich im mittleren Gipfel die übrigen kontaminierenden Proteine finden.
- 7.3. Im Bereich des ersten Extinktionsgipfels lagen die Eiweißkonzentrationen, die mit der Biuretmethode bestimmt worden waren, immer niedriger als sie nach den Ergebnissen der Extinktionsmessung zu erwarten gewesen wären. Dies deutet auf einen hohen Gehalt des Faktors VIII an den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan hin.
- 7.4. Faktor VIII_{Ap} zeigte ein stark asymmetrisches Elutionsverhalten, wobei sich die Hauptmasse immer im Bereich des ersten Elutionspeaks fand. Dieses Elutionsverhalten zeigte keine Abhängigkeit von der Art

des Antikoagulans oder der verwendeten Heparindosis. Da eine Rechromatographie einer definierten Molekularpopulation des Faktors VIII nur eine schwache Reaktion mit der Gelmatrix zeigte, muß eine breite Streuung der Molekularmasse des Faktors VIII angenommen werden.

5. Faktor VIII_{COAG} eluierte stets sehr asymmetrisch, wobei der Hauptaktivitätsgipfel mit dem Faktor-VIII_{AP}-Gipfel zusammenfiel. Hier zeigte die Rechromatographie eine starke Reaktion mit der Gelmatrix, was die Asymmetrie des Elutionsmusters zum Teil erklärt. Weil aber sowohl bei der Isolierung aus Citrat- und auch aus Heparinplasma ein zweiter Aktivitätsgipfel im Bereich des dritten Extinktionspeaks zu beobachten ist, muß davon ausgegangen werden, daß im Plasma in geringen Mengen "freier" Faktor VIII_{COAG} vorhanden ist.
6. Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf einen Aufbau des Faktors VIII aus einem hochmolekularen Protein mit den Eigenschaften Faktor VIII_{AP} und Faktor VIII_{VWF} und einem niedermolekularen Protein mit der Eigenschaft Faktor VIII_{COAG} hin, die durch hydrophobe Bindungen miteinander verbunden sind. Das hochmolekulare Protein ist dabei aus identischen Untereinheiten

aufgebaut, die durch Disulfidbrücken verbunden sind.

- 7.7. Das Fibrinogen eluierte immer mit der Hauptmasse im Bereich des zweiten Extinktionsgipfels und zeigte keine Abhängigkeit von der Art des Antikoagulans oder der verwendeten Heparindosis.
- 7.8. Die Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Citrat ergaben, daß Citrat weder mit dem Faktor VIII noch mit Fibrinogen reagiert.
- 7.9. Im Gegensatz dazu zeigten die Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Heparin eine Anlagerung des Heparins sowohl an den Faktor VIII als auch an das Fibrinogen. Da die chromatographischen Untersuchungen keine Unterschiede zwischen den Faktor-VIII-Isolierungen aus Citrat- und Heparinplasma ergaben, hat sich möglicherweise nur der isoelektrische Punkt des Faktors VIII bzw. des Fibrinogens geändert.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ADDIS, T.
The pathogenesis of hereditary hemophilia
J. Pathol. Bacteriol. 15, 427, 1911
- 2) ARONSON, D.L., J.W. PREISS, M.W. MOSESSON
Molecular weights of factor VIII (AHF) and factor IX
(PTC) by electron irradiation
Thromb. Diath., Haemorrh. 8, 270, 1962
- 3) ATICHARTAKARN, V., V.J. MARDER, E.P. KIRBY, A.Z. BUDZYNSKI
Effects of enzymatic degradation on the subunit
composition and biologic properties of human factor VIII
Blood 51, 281, 1978
- 4) BARBUI, T., R. BATTISTA, E. DINI
Relationship between ristocetin-induced platelet-
aggregation and factor VIII (activity and antigen)
in v. Willebrand's disease
Blut, 29, 260, 1974
- 5) BARBUI, T., E. DINI
Dissociation between factor VIII (activity and antigen)
and ristocetin-induced platelet aggregation in
von Willebrand's disease
Acta Haematol. (Basel) 52, 44, 1975
- 6) BARROW, E.M., J.B. GRAHAM
Kidney antihemophilic factor. Partial purification and
some properties
Biochemistry 7, 3917, 1968
- 7) BAUGH, R., J. BROWN, R. SARGEANT, C. HOUGIE
Separation of human factor VIII activity from the von
Willebrand's antigen and ristocetin platelet aggregation
Biochem. Biophys. Acta 371, 360, 1974
- 8) BECK, E.A., P. BACHMANN, P. BARBIER, M. FURLAN
Importance of protease inhibition in studies on
purified factor VIII (antihaemophilic factor)
Thrombos. Haemost. 35, 186, 1976

- 9) BENNETT,B., O.D.RATNOFF
Studies on the response of patients with classic hemophilia to transfusion with concentrates of antihemophilic factor
J. Clin. Invest. 51, 2593, 1972

- 10) BENNETT,B., O.D.RATNOFF, J.LEVIN
Immunologic studies in von Willebrand's disease
J. Clin. Invest. 51, 2597, 1972

- 11) BIGGS,R.
The absorption of human factor VIII neutralizing antibody by factor VIII
Br. J. Haemat. 26, 259, 1974

- 12) BLECHER,T.E., J.C.WESTBY, M.J.THOMPSON
Synthesis of procoagulant antihemophilic factor in vitro
The Lancet 1, 1333, 1978

- 13) BLOMBACK,B., HESSEL,G.SAVIDGE, L.WIKSTRÖM, M.BLOMBACK
The effect of reducing agents on factor VIII and other coagulation factors
Thromb. Res. 12, 1177, 1978

- 14) BLOOM,A.L., J.C.GIDDINGS, I.R.PEAKE
Low-molecular weight factor VIII
Lancet 1, 661, 1973

- 15) BLOOM,A.L., J.C.GIDDINGS, C.J. WILKS
Factor VIII on the vascular intima: Possible importance in haemostasis and thrombosis
Nature (New Biol.) 241, 217, 1973

- 16) BLOOM,A.L., I.R.PEAKE, J.C.GIDDINGS
The presence and reactions of high and lower-molecular-weight procoagulant factor VIII in the plasma of patients with von Willebrand's disease after treatment: Significance for a structural hypothesis for factor VIII
Thromb. Res. 3, 389, 1973

- 17) BOUMA, B.N., J.A.VAN MOURIK, Y.WIEGRINCK, J.J.SIXMA,
I.A.MOCHTAR
Immunological characterization of anti-haemophilic
factor A related antigen in haemophilia A
Scand. J. Haemat. 11, 184, 1973
- 18) BRINKHOUS, K.M., J.E.GRAHAM, H.A.COOPER, J.P.ALLAIN,
R.H.WAGNER
Assay of von Willebrand factor in von Willebrand's
disease and hemophilia: Use of a macroscopic platelet
aggregation test
Thromb. Res. 6, 267, 1975
- 19) CAEN, J.
Effect of normal and hemophilic plasma on AHG activity
and long bleeding times in von Willebrand's disease
In: K.M.BRINKHOUS (Ed): The Hemophilias, University of
North Carolina Press, Chapel Hill, NC, 1964, pp. 276
- 20) COOPER, H.A., T.R.GRIGGS, R.H.WAGNER
Factor VIII recombination after dissociation by CaCl_2
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2326, 1973
- 21) COOPER, H.A., R.H.WAGNER
The defect in hemophilic and von Willebrand's disease
plasma studied by a recombination technique
J. Clin. Invest. 54, 1093, 1974
- 22) DENSON, K.W.E., R.BIGGS, M.E.HADDON, R.BORRETT, K.COBB
Two types of haemophilia (A and A⁻): A study of 48 cases
Br. J. Haemat. 17, 163, 1969
- 23) DE LOS SANTOS, R.P., L.W.HOYER
Antihemophilic factor in tissues: Localization by
immunofluorescence
Fed. Proc. 31, 262, 1972
- 24) EKERT, H., S.I.CHAVIN
Changes in electrophoretic mobility of human factor
VIII-related antigen: Evidence for subunit structure
Br. J. Haemat. 36, 271, 1977

- 25) FURLAN, M., E.A.BECK
Strukturmodell vom Faktor-VIII-Komplex
Schweiz. Med. Wschr. 106, 1378, 1976

- 26) FURLAN, M., E.A.BECK
Degradation of purified factor VIII by endogenous
contaminating enzymes
Thromb. Res. 10, 153, 1977

- 27) GOBBI, F.
The fractionation properties of human factor VIII
(antihaemophilic factor)
Thromb. Diath. Haemorrh. 4, 253, 1960

- 28) GORDON, N.R., N.R.SHULMAN
The effect of clotting on the structure and function
of human factor VIII
Ann. N.Y. Sci. 240, 79, 1975

- 29) GRAHAM, J.B., G.J.C.INGRAM
Preliminary report of the task force on nomenclature
of factor VIII related activities
Int. Soc. Thrombosis and Haemostasis, Paris 1975

- 30) GRALNICK, H.R., S.L.MARCHESI, B.S.COLLER
Theoretical approach to molecular biology of factor VIII:
Heterogeneity of the molecule
Ann. N.Y. Sci. 240, 378, 1975

- 31) GRUSON, R., P.B.A.KERNOFF
Diagnostik des von-Willebrand-Jürgens-Syndroms mit
Hilfe der quantitativen immunologischen Bestimmung
des Faktor-VIII-assoziierten Antigens
Dtsch. Med. Wschr. 99, 1593, 1974

- 32) HEIMBURGER, N., H.TROBISCH
Blutgerinnung und Fibrinolyse
Ang. Chemie 3, 89, 1971

- 33) HERSHGOLD, E.J., A.M.DAVISON, M.E.JANSZEN
Isolation and some chemical properties of human
factor VIII (antihemophilic factor)
L. Lab. Clin. Med. 77, 185, 1971
- 34) HOLMBERG, L.
Purification of FVIII by antigen-antibody
chromatography
Thromb. Res. 12, 667, 1978
- 35) HOUGIE, C., K.W.E.DENSON, R.BIGGS
A study of the reaction product of factor VIII and
factor IX by gel filtration
Thromb. Diath. Haemorrh. 18, 211, 1967
- 36) HOUGIE, C., R.B.SARGEANT, J.E.BROWN, R.F.BAUGH
Evidence that factor VIII and ristocetin aggregating
factor (VIIIrist) are separate molecular entities
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147, 58, 1974
- 37) HOWARD, M.A., B.G.FIRKIN
Ristocetin - a new tool in the investigation of
platelet aggregation
Thromb. Diath. Haemorrh. 26, 362, 1971
- 38) HOWARD, M.A., R.J.SAWERS, B.G.FIRKIN
Ristocetin: A means of differentiating von Willebrand's
disease in two groups
Blood 41, 687, 1973
- 39) HOYER, L.W., R.T.BRECKENRIDGE
Immunologic studies of antihemophilic factor.
II. Properties of CRM
Blood 35, 809, 1970
- 40) HOYER, L.W., R.P.DE LOS SANTOS, J.R.HOYER
Antihemophilic factor antigen. Localization in
endothelial cells by immunofluorescent microscopy
J. Clin. Invest. 52, 2737, 1973

- 41) JAFFE, E.A., L.W.HOYER, R.L.NACHMANN
Synthesis of antihemophilic factor antigen by
cultured human endothelial cells
J. Clin. Invest. 52, 2757, 1973

- 42) JAFFE, E.A., L.W.HOYER, R.L.NACHMANN
Synthesis of von Willebrand factor by cultured
human endothelial cells
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1906, 1974

- 43) JAFFE, E.A.
Synthesis of factor VIII antigen by cultured human
endothelial cells
Ann. N.Y. Sci. 240, 62, 1975

- 44) JENKINS, C.S.P., D.MEYER, M.D.DREYFUS, M.J.LARRIEU
Willebrand factor and ristocetin
I. Mechanism of ristocetin-induced platelet aggregation
Br. J. Haemat. 28, 561, 1974

- 45) JÖRGENS, R., H.FORSIUS
Untersuchungen über die "konstitutionelle Thrombopathie
(v.Willebrand-Jürgens)" auf den Aalandsinseln
Schweiz. Med. Wschr. 81, 1248, 1951

- 46) JÖRGENS, R., W.LEHMANN, O.WEGELIUS, A.W.ERIKSSON, E.HIEPLER
Mitteilung über den Mangel an antihäophilem Globulin
(Faktor VIII) bei aaländischer Thrombopathie (von
Willebrand-Jürgens)
Thromb. Diath. Haemorrh. 1, 257, 1957

- 47) KOUTTS, J., N.GUDE, B.G.FIRKIN
The dynamic inter-relationship between factor VIII
and von Willebrand factor
Thromb. Res. 8, 533, 1976

- 48) LANGDELL, R.E.
Partial thromboplastin time techniques
In: N.U.BANG, F.K.KELLER, E.DEUTSCH, E.F.MAMMEN (Eds):
Thrombosis and Bleeding Disorders - Theory and Methods
Academic Press New York 1971, pp. 76

- 49) LAURELL, C.-B.
Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies
Anal. Biochem. 15, 45, 1966

- 50) LEGAZ, M.E., M.J.WEINSTEIN, C.M.HELDEBRANT, E.W.DAVIE
Isolation, subunit structure and proteolytic modification of bovine factor VIII
Ann. N.Y. Sci. 240, 43, 1975

- 51) MANCINI, G., O.CARBONARA, J.F.HEREMANS
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion
Immunochemistry 2, 235, 1965

- 52) MCKEE, P.A.
Purification and electrophoretic analysis of human antihemophilic factor (factor VIII)
Fed. Proc. 29, 647, 1970

- 53) MCKEE, P.A., J.C.ANDERSON, M.E.SWITZER
Molecular structural studies of human factor VIII
Ann. N.Y. Sci. 240, 8, 1975

- 54) MEYER, D., J.-M.LAVERGNE, M.J.LARRIEU, F.JOSSO
Cross-reacting material in congenital factor VIII deficiencies (haemophilia A and von Willebrand's disease)
Thromb. Res. 1, 183, 1972

- 55) MEYER, D., C.S.P.JENKINS, M.D.DREYFUS, E.FRESSINAUD, M.-J.LARRIEU
Willebrand factor and ristocetin
II. Relationship between Willebrand factor, Willebrand antigen factor VIII activity
Br. J. Haemat. 28, 579, 1974

- 56) VAN MOURIK, J.A., B.N.BOUA, W.T.LABRUYERE, S.DE GRAAF, I.A.MOCHTAR
Factor VIII, a series of homologous oligomers and a complex of two proteins
Thromb. Res. 4, 155, 1974

- 57) OLSON, J.D., W.J. BROCKWAY, D.N. FASS, M.A. MAHNUSON, E.J.W. BOWIE
Evaluation of ristocetin - Willebrand factor assay and ristocetin-induced platelet aggregation
Am. J. Clin. Pathol. 63, 210, 1975
- 58) OWEN, W.G., R.H. WAGNER
Antihemophilic factor: Separation of an active fragment following dissociation by salts or detergents
Thromb. Diath. Haemorrh. 27, 502, 1972
- 59) PENICK, G.D., H.R. ROBERTS, C.W. MCMILLAN
Assays for antihemophilic factor (factor VIII)
In: N.U. BANG, F.K. KELLER, E. DEUTSCH, E.F. MAMMEN (Eds): Thrombosis and Bleeding Disorders - Theory and Methods
Academic Press, New York, 1971, p. 189
- 60) POON, MAN CHIU, O.D. RATNOFF
Evidence that functional subunits of antihemophilic factor (factor VIII) are linked by noncovalent bonds
Blood, 48, 87, 1976
- 61) POON, MAN CHIU, O.D. RATNOFF
Immunologic evidence that the antihemophilic factor (factor VIII) like material in hemophilic plasma possess a nonfunctional low molecular weight subcomponent
Blood 50, 367, 1977
- 62) RICK, M.E., L.W. HOYER
Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII)
Immunologic properties of AHF subunits produced by salt dissociation
Blood 42, 737, 1973
- 63) SANDERSON, J.H., A.M. BURN, S. COOKE
Platelet responses to ristocetin in von Willebrand's disease
Scand. J. Haemat. 12, 248, 1974

- 64) SCHWICK, H.G., H.TROBISCH, N.HEIMBURGER
Leistungsfähigkeit und Grenzen immunologischer
Methoden in der Gerinnungsdiagnostik
Internist 14, 160, 1973
- 65) SHAPIRO, G.A., J.C.ANDERSEN, S.V.PIZZO, P.A.MCKEE
The subunit structure of normal and hemophilic factor VI
J. Clin. Invest. 52, 2198, 1973
- 66) SHEARN, S.A.M., I.R.PEAKE, J.C.GIDDINGS, J.HUMPHRYS,
A.L.BLOOM
The characterization and synthesis of antigens related
to factor VIII in vascular endothelium
Thromb. Res. 11, 43, 1977
- 67) STEAD, N.W., P.A.MCKEE
Destruction of factor VIII procoagulant activity in
tissue culture media
Blood 52, 408, 1978
- 68) SWITZER, M.E., P.A.MCKEE
Studies on human antihemophilic factor. Evidence for
a covalently linked subunit structure
J. Clin. Invest. 57, 925, 1976
- 69) THELIN, G.M., R.H.WAGNER
Sedimentation of plasma antihemophilic factor
Arch. Biochem. Biophys. 95, 70, 1961
- 70) THOMSON, C., C.D.FORBES, C.R.M.PRENTICE
Evidence for a qualitative defect in factor-VIII-
related antigen in von Willebrand's disease
The Lancet 1, 594, 1974
- 71) TROBISCH, H., E.JACOBI
Zur Diagnostik und Therapie von Hämostasestörungen
1. Physiologie und Pathophysiologie der Hämostase
Internist. prax. 16, 255, 1976

- 72) TROBISCH, H.
Isolierung und biochemische Charakterisierung des
Gerinnungsfaktors VIII
Die Medizinische Verlagsgesellschaft 1978
- 73) WEISS, H.J., L.L. PHILIPS, W. ROSNER
Separation of subunits of antihemophilic factor (AHF)
by agarose gel chromatography
Thromb. Diath. Haemorrh. 27, 212, 1972
- 74) WEISS, H.J., J. ROGERS, H. BRAND
Further studies on the von Willebrand factor
(factor VIII) ristocetin-induced platelet aggregation
Blood, 40, 939, 1972
- 75) WEISS, H.J., J. ROGERS, H. BRAND
Defective ristocetin-induced platelet aggregation in
von Willebrand's disease and its correction by factor VIII
J. Clin. Invest. 52, 2697, 1973
- 76) WEISS, H.J., L.W. HOYER
Von Willebrand factor: Dissociation from antihemophilic
factor procoagulant activity
Science 182, 1149, 1973
- 77) VON WILLEBRAND, E.A.
Über hereditäre Pseudohämophilie
Acta Med. Scand. 76, 521, 1931
- 78) VON WILLEBRAND, E.A., R. JØRGENSEN
Über eine neue Bluterkrankheit, die konstitutionelle
Thrombopathie
Dtsch. Arch. Klin. Med. 175, 453, 1933
- 79) ZIMMERMANN, T.S., O.D. RATNOFF, A.E. POWELL
Immunologic differentiation of classic hemophilia
(factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease
J. Clin. Invest. 50, 244, 1971

- 80) ZIMMERMANN, T.S., T.S. EDGINGTON
Factor VIII coagulant activity and factor VIII-like
antigen:
Independent molecular entities
J. Exp. Med. 138, 1015, 1973
- 81) ZIMMERMANN, T.S., J. ROBERTS, T.S. EDGINGTON
Factor-VIII-related antigen:
Multiple molecular forms in human plasma
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 5121, 1975

An dieser Stelle möchte ich

Herrn Priv.Doiz. Dr. med. H. Trobisch für die

Überlassung des Themas und die wertvollen

Ratschläge während der Bearbeitung danken.

LEBENS LAUF

- 25.3.1955 als Sohn der Eheleute Hermann Bloemer und Angelika Bloemer, geb. Winter, in Mönchengladbach-Rheydt geboren
- 1961 - 1965 Besuch der Kath. Volksschule in Jüchen-Hochneukirch
- 1965 Wechsel auf das Städt. Gymnasium in Mönchengladbach-Odenkirchen
- 1973 Ablegen der Reifeprüfung am selben Gymnasium
- WS 1973 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Düsseldorf
- 25.8.1975 Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung
- 31.8.1976 Ablegen des Ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
- 31.8.1978 Ablegen des Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
- Zur Zeit im Praktischen Jahr an den Städtischen Krankenanstalten
Lukaskrankenhaus Neuss

